

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Mise au point d'un modèle d'apoptose in vitro de la maladie de Parkinson

Morel, Marina

Award date:
2002

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

**MISE AU POINT D'UN MODÈLE D'APOPTOSE IN VITRO DE LA MALADIE DE
PARKINSON**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Marina MOREL

Juin 2002

INTRODUCTION

AVANT-PROPOS GENERAL

L'espérance de vie de l'homme a considérablement augmenté ces dernières décennies. En parallèle, l'incidence de nombreuses maladies liées au vieillissement prématuré et à la neurodégénérescence a également grandement augmenté.

Dans le cadre de ce mémoire, nous nous intéresserons à la maladie de Parkinson qui est la maladie neurodégénérative la plus répandue après la maladie d'Alzheimer. Cette maladie est caractérisée par une neurodégénérescence de certains neurones. Cette neurodégénérescence semble être due en grande partie à une mort par apoptose. Cependant, la cause de la perte des neurones liés au développement de la maladie est controversée. On note cependant une déficience au niveau du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale dans les neurones touchés.

Etant donné que le but de ce mémoire sera de développer un modèle d'étude in vitro de la maladie de Parkinson dans lequel l'apoptose est induite par des inhibiteurs spécifiques d'un des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale à savoir, le complexe I (NADH-Ubiquinone réductase) nous décrirons dans cette introduction successivement la maladie de Parkinson, l'apoptose et la chaîne respiratoire mitochondriale.

I. LA MALADIE DE PARKINSON

I.1: Définition et symptômes

La maladie de Parkinson touche en France environ 100.000 personnes. Cette maladie neurodégénérative affecte environ 1 % de la population âgée de 50 ans (Greenamyre et al. 1999).

Sur le plan histologique, cette maladie est caractérisée par une dégénérescence des neurones dopaminergiques principalement au niveau de la pars compacta de la substance

noire (Olanow et al. 1999) et par la formation d'inclusions fibrillaires cytoplasmiques, appelées corps de Lewy, dans des zones atteintes (Betarbet et al. 2000). Une coloration éosinophile permet d'observer un noyau homogène dense et entouré d'un halo périphérique dans ces corps.

Les symptômes diagnostiques sont les tremblements de repos, la rigidité, l'akinésie ou la bradykinésie. Les tremblements parkinsoniens touchent principalement les membres inférieurs et supérieurs. Ils apparaissent ou s'aggravent en situation de repos et de stress émotionnel et disparaissent dès le début d'un mouvement volontaire. La rigidité ou hypertonie est la conséquence d'une insuffisance du relâchement musculaire. Les muscles sont contractés en permanence. Cette raideur concerne surtout la colonne vertébrale et la racine des membres. L'akinésie est la difficulté à débiter les mouvements. En effet, l'initiation du geste est hésitante. Son exécution est lente, d'autant plus que le mouvement se prolonge. Le visage est figé, inexpressif. Les mouvements de la tête et les clignements des yeux se font rares.

D'autres signes viennent s'ajouter aux troubles moteurs comme les perturbations gastro-intestinales, des oedèmes, l'irrégularité de la température corporelle. Il y a finalement des modifications psychiques telles que l'anxiété qui peut devenir chronique, la dépression ou des crises de panique.

L'origine des troubles moteurs est causée par la perte neuronale des différents noyaux du système nerveux central, notamment les neurones de la pars compacta de la substance noire (figure I.1.). Cependant, la dégénérescence n'est pas limitée à cette seule zone. En effet, des zones telles que le locus ceruleus, la substance innominata (Schapira 1998), l'hypothalamus et le noyau moteur du nerf crânien (Olanow et al. 1999) peuvent aussi être touchées.

Les troubles décrits ci-dessus apparaissent quand plus de 85 % de la population de neurones dopaminergiques sont atteints. Ces neurones ne représentent que 5 % de la population totale de cellules (Schapira 1998), mais ils sont essentiels à la régulation des mouvements volontaires.

I.2: Production de dopamine

La dopamine est un neurotransmetteur inhibiteur intermédiaire de la voie de synthèse des catécholamines. Les catécholamines se caractérisent par la présence d'un noyau benzénique portant deux groupes hydroxyles (-OH).

Cette voie débute avec un acide aminé, la tyrosine (figure I.2.). La tyrosine est hydroxylée en L-Dopa par la tyrosine hydroxylase. La L-Dopa est ensuite décarboxylée en dopamine. Les étapes suivantes permettent d'obtenir la noradrénaline et l'adrénaline. Cependant la voie de synthèse s'arrête à la production de dopamine dans certaines régions du cerveau, en particulier la substance noire (figure I.3.). La dopamine est ensuite stockée dans des vésicules.

Une fois libérée dans la fente synaptique, la partie qui ne fixe pas le récepteur est dégradée par la cathécol-O-méthyl-transférase (COMT). L'autre partie est récupérée activement par le neurone présynaptique et peut être réutilisée. D'autre part, au sein des cellules présynaptiques, la dopamine peut être détruite par l'action d'une enzyme spécifique la monoamine oxydase (MAO) présente naturellement dans le cytoplasme de ces cellules (figure I.4.).

Sur le plan anatomique, les neurones dopaminergiques partent de la substance noire et se projettent sur le striatum (noyau caudé et putamen) où ils facilitent l'initiation des mouvements volontaires. Une fonction motrice normale est assurée par un équilibre entre la production de dopamine (neurotransmetteur inhibiteur) et celle de l'acétylcholine (neurotransmetteur exciteur).

En condition pathologique, notamment dans le cas de la maladie de Parkinson, une déplétion en dopamine est observée. Ceci entraîne un déséquilibre entre l'inhibiteur (la dopamine) et l'excitateur (l'acétylcholine). On observe alors une activité cholinergique excessive qui se marque par des tremblements, de la rigidité et de l'akinésie.

I.3: Etiologie de la maladie de Parkinson

L'origine de la maladie de Parkinson est encore inconnue. Toutefois, certaines hypothèses sont envisagées. Ainsi, on peut citer des facteurs génétiques et des facteurs environnementaux.

I.3.1. Facteurs génétiques

Environ 5 à 10 % de patients atteints de la maladie de Parkinson ont une forme familiale de la maladie. L'observation de certaines familles a permis d'identifier la maladie comme une maladie héréditaire autosomale dominante. Des études ont permis d'identifier trois gènes qui pourraient être impliqués dans le développement de la pathologie : l' α -synucléine, la parkine et l'ubiquitin-C-terminal hydrolase L1. Les produits de ces gènes sont soit impliqués dans le fonctionnement du protéasome soit dégradés par la machinerie du protéasome des cellules. Chez des patients, les études histologiques ont montré que les produits de ces trois gènes sont concentrés dans les corps de Lewy et en particulier l' α -synucléine qui se trouve sous forme fibrillaire (Betarbet et al. 2000).

L'analyse de la séquence du gène α -synucléine chez les patients montre une substitution d'un acide aminé alanine par une thréonine en position 53. Chez ces patients, cette mutation pourrait altérer la structure de la protéine α -synucléine et favoriser l'agrégation de la protéine. Celle-ci est alors difficilement détruite par le protéasome. Néanmoins, une mutation du gène de l' α -synucléine n'est pas une condition nécessaire au développement du phénotype parkinsonien. En effet, une mutation dans ce gène n'a pas été identifiée chez la plupart des patients atteints de la maladie, mais les corps de Lewy contenaient cependant de l' α -synucléine. Cela suggère que l'accumulation et non la mutation de l' α -synucléine pourrait jouer un rôle central dans le développement de la maladie de Parkinson (Olanow et al. 1999).

Si l'implication de ces gènes dans la forme familiale de la maladie de Parkinson est bien décrite, elle ne permet cependant d'expliquer qu'un très petit nombre de cas de maladie de Parkinson. D'autres recherches suggèrent qu'une mutation au niveau du génome mitochondrial pourrait être responsable de l'apparition du phénotype parkinsonien. Ces mutations ont pour conséquence un dysfonctionnement du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale. Le complexe I est un des complexes intervenant dans la phosphorylation oxydative. Ce complexe est composé de 41 sous-unités dont 7 sont encodées au niveau de l'ADN mitochondrial. L'ADN mitochondrial est une molécule circulaire double brin. Le génome mitochondrial est plus souvent soumis à des altérations que l'ADN nucléaire. Ainsi, une délétion de 5 kb est assez fréquente dans différentes pathologies. Cependant, à nouveau, cette délétion n'est pas une condition nécessaire à l'apparition du phénotype

parkinsonien. On peut aussi trouver des mutations dans des gènes codant pour des ARN de transfert ou des mutations ponctuelles dans le génome mitochondrial (Swerdlow et al. 1996).

Même si les facteurs génétiques ont été découverts comme étant responsables d'un certain nombre de cas de maladie de Parkinson familiale, ils ne semblent pas jouer un rôle majeur dans la forme sporadique de la maladie de Parkinson.

I.3.2. Facteurs environnementaux

Des études épidémiologiques indiquent qu'un certain nombre de facteurs externes pourraient représenter un risque réel dans le développement de la maladie de Parkinson. Ainsi certaines toxines ont été associées à l'apparition de la maladie de Parkinson y inclus des traces de métaux, du cyanure, des solvants organiques, le monoxyde de carbone, des pesticides, des herbicides et certains produits utilisés dans les usines de pâtes à papier.

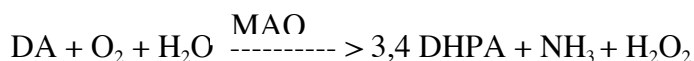
Le meilleur exemple du rôle des facteurs externes dans le développement de la pathologie est sans doute la toxine 1,2,3,6-méthyl-phényl-tétrahydropyridine (MPTP). Cette toxine a été identifiée au début des années '80 lorsque de jeunes drogués présentaient les symptômes de la maladie de Parkinson. Des analyses ont permis de découvrir un produit secondaire dérivé d'un des composants de ces drogues, le MPTP. Dans l'organisme, ce produit est transformé en MPP⁺ (1-méthyl-4-phénylpyridinium). Cette molécule est capable de pénétrer dans les cellules dopaminergiques via les transporteurs dopaminergiques où elle inhibe le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale. L'inhibition de ce complexe conduit à la mort de la cellule (voir point IV).

I.4: Pathogenèse

Si la ou les cause(s) première(s) du développement de la maladie de Parkinson ne sont pas encore connues, il semble que certaines caractéristiques physiopathologiques soient cependant souvent présentes dans les neurones en dégénérescence. Il s'agit du stress oxydatif, de la déficience de la respiration mitochondriale et de l'apoptose. Nous décrirons brièvement ces trois conditions ci-dessous.

I.4.1. Stress oxydatif

Un excès de production de radicaux libres semblent jouer un rôle majeur dans le développement du phénotype parkinsonien. Une source de radicaux libres pourrait être le métabolisme oxydatif de la dopamine.

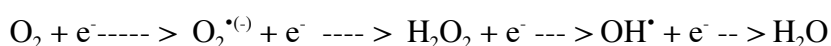


La monoamine oxydase oxyde la dopamine en acide 3,4-dihydrophénylacétique.

Ainsi dans les cas où le turnover de la dopamine augmente, cette réaction conduit à une augmentation de la production de radicaux libres. Ceux-ci peuvent alors provoquer des dommages oxydatifs au niveau des lipides membranaires et au niveau des protéines dans les neurones dopaminergiques. Finalement, le métabolisme de la cellule est perturbé et ce qui pourrait entraîner la mort de la cellule (Thiffault et al. 2000). Des études *post mortem* ont confirmé qu'un stress oxydatif pouvait être à l'origine du développement de la maladie de Parkinson (Lotharius et al. 2000).

I.4.2. Dysfonctionnement mitochondrial

L'augmentation de radicaux libres peut aussi résulter d'un défaut dans la chaîne respiratoire mitochondriale, en particulier au niveau du complexe I. En effet, en condition physiologique, 98 à 99 % de l'oxygène moléculaire est réduit de façon tétravalente en H_2O au niveau de la chaîne de transport d'électrons. Les 1 à 2 % d'oxygène restant sont réduits de façon monovalente selon la cascade monovalente de l'oxygène (Parker et al. 1994).



Lors d'une inhibition du complexe I, les électrons qui entrent dans la chaîne de transport des électrons s'accumulent au niveau des transporteurs. Ils peuvent alors réduire directement l'oxygène et engendrer des espèces réactives radicalaires. Une autre conséquence

de la perte d'activité du complexe I est la baisse du taux de régénération de l'ATP. La cellule n'a alors plus assez d'énergie et finalement meurt.

Sherer et al (Sherer et al. 2001) ont pu mettre en évidence in vivo qu'une réduction de 15 à 30% de l'activité du complexe I de la chaîne de transport d'électrons était suffisante pour faire apparaître les premiers signes de la maladie de Parkinson. Chez les patients, une diminution de 30 à 40 % de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire a été mesurée au niveau du système nerveux central (Schapira et al. 1990). Cependant, la cause de cette diminution d'activité du complexe I reste inconnue.

I.4.3. Apoptose et maladie de Parkinson

A la suite d'un manque d'énergie ou d'une production excessive de radicaux libres, les cellules nerveuses meurent et cette mort cellulaire pourrait être due à de l'apoptose. En effet, Kitamura et al (Kitamura et al. 1998) ont observé différents paramètres caractéristiques de l'apoptose dans le cerveau de patients atteints de la maladie de Parkinson. Par exemple, ils ont mis en évidence une fragmentation de l'ADN en fragments d'environ 180 pb, la condensation de la chromatine ou encore la perte du volume cellulaire. De plus, Hartmann et al ont observé la présence de caspases activées dans les neurones dopaminergiques de la substance noire (Hartmann et al. 2000). Enfin, une expression plus importante de Bax, une molécule pro-apoptotique a été mise en évidence dans le cerveau de patients atteints de la maladie de Parkinson (Hartmann et al. 2001).

I.5: Traitements actuels

Les traitements actuels sont essentiellement axés sur la prise de médicaments. Ceux-ci retardent l'apparition des symptômes de la maladie chez les patients. Leurs sites d'action sont cependant différents. Parmi les traitements possibles, on peut citer la lévodopa qui est un précurseur de la dopamine (substance qui fait défaut chez ces patients) et est transformée en ce produit par la dopa-décarboxylase cérébrale. La lévodopa est le médicament le plus souvent prescrit en raison de son efficacité. Cette molécule a, en effet, la capacité d'améliorer les symptômes caractéristiques de la maladie de Parkinson comme les tremblements, la rigidité et l'akinésie. Cependant, des effets secondaires accompagnent aussi la prise de ce médicament. Au début du traitement, le patient peut être sujet à des troubles digestifs comme

des nausées, des vomissements ainsi que des cauchemars et des hallucinations. A long terme, des troubles moteurs graves peuvent apparaître suite à l'absorption de la lévodopa. C'est pourquoi d'autres médicaments peuvent être envisagés. Comme la dopamine est dégradée par la monoamine oxydase-B (MAO-B), des inhibiteurs de la MAO-B tels que la sélégiline ont été développés. La sélégiline est capable de freiner l'évolution de la maladie en allongeant la durée d'action de la dopamine. Cependant, les mécanismes de protection ne sont pas encore clairement établis. Enfin, des agonistes de la dopamine sont aussi utilisés comme la bromocriptine, un agoniste des récepteurs D_2 ou le pergolide, un agoniste des récepteurs D_1 et D_2 . Cependant, même avec une prise régulière de médicaments et un suivi médical constant, la maladie progresse avec l'âge et certains signes deviennent inévitablement permanents (Sheenan 2000). Outre la médication, d'autres stratégies ont été développées telles que la greffe de neurones d'embryons humains et des techniques de stimulation cérébrale profonde où une charge électrique est transmise à la base du cerveau à l'aide d'un fil. D'autres voies se sont révélées prometteuses, comme la stimulation du thalamus. Cette technique est efficace contre les tremblements, mais ne produit aucun effet contre la rigidité. Il se peut que la stimulation d'autres parties du tronc cérébral soit plus efficace. Parmi les mesures non pharmacologiques, l'exercice physique et la physiothérapie peuvent retarder la perte de la maîtrise des mouvements. Actuellement, de grands efforts sont déployés dans la recherche de moyens thérapeutiques destinés à soigner les patients atteints de la maladie de Parkinson.

I.6: Conclusion

La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative qui est caractérisée essentiellement par des troubles moteurs. Diverses hypothèses ont été proposées afin d'expliquer l'apparition de la pathologie. Deux d'entre elles ont retenu notre attention. D'une part, au niveau cellulaire, différentes observations suggèrent que les cellules meurent par apoptose. D'autre part, au niveau moléculaire, l'inhibition du complexe I de la chaîne de transport d'électrons au niveau des mitochondries semble jouer un rôle important. C'est pourquoi, dans la suite de cette introduction, seront détaillés l'apoptose et le rôle des mitochondries.

II. L'APOPTOSE

II.1: Définitions

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un mécanisme normal dans le développement embryonnaire (Mignon 1998).

Outre le rôle primordial de l'apoptose dans la morphogenèse des membres (Saikumar et al. 1999) et l'organisation du système nerveux central, l'apoptose joue un rôle central dans l'élaboration du système immunitaire (Mignon 1998). En effet, c'est par apoptose que les lymphocytes T et B nuisibles ou inutiles qui ne répondent pas aux exigences de notre système de défense sont éliminés. C'est aussi par apoptose que meurent les cellules nerveuses excédentaires générées lors de l'embryogenèse. Un dernier exemple est le rôle de l'apoptose dans la régression de la queue du têtard ou des tissus joignant les doigts des mammifères.

Si l'apoptose représente un grand intérêt pour l'organisme, c'est parce qu'elle permet une élimination en douceur de la cellule sans endommager le tissu périphérique (Bousquet 1995). On pouvait donc s'attendre à ce que toute dérégulation de ce programme de mort ait des conséquences néfastes sur l'organisme. On en a aujourd'hui la preuve grâce à des travaux de plus en plus nombreux mettant en cause de telles perturbations dans diverses maladies chez l'homme. Réprimé dans le cas de certains cancers, de maladies auto-immunes ou de maladies virales et activée dans le cas d'autres maladies telles que le SIDA et certaines maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson. La mort cellulaire programmée est donc devenue une cible de choix pour les traitements de demain.

A la notion d'apoptose s'oppose celle de la nécrose. La nécrose est une mort accidentelle et catastrophique en ce sens que le contenu enzymatique de la cellule est déversé dans le tissu périphérique entraînant des dommages au sein de ce tissu (Ameisen 1996). Certaines caractéristiques sont propres à la nécrose telles le gonflement de la cellule, la rupture de la membrane plasmique, les réactions inflammatoires (Kelekar et al. 1998).

Il faut cependant remarquer que les deux types de mort cellulaire peuvent se passer en même temps dans des tissus ou dans les cultures cellulaires soumis à un même stimulus

toxique. C'est alors l'intensité du stimulus qui détermine dans quelle voie la cellule va s'engager. Ce choix, on le verra, se passe au niveau de la mitochondrie qui est en quelque sorte le carrefour décisionnel.

Au niveau morphologique, une cellule qui meurt par apoptose se fragmente et forme des vésicules. Ces vésicules sont ensuite phagocytées par les cellules voisines ou les macrophages. L'expression de certaines molécules telles que la phosphatidyl sérine en surface de la cellule en apoptose permet aux cellules phagocytaires d'identifier les cellules engagées dans ce processus et de les ingérer (Ameisen 1996).

II.2: Caractéristiques de l'apoptose

L'apoptose se caractérise à la fois par des aspects morphologiques et biochimiques. A l'inverse de la nécrose, l'apoptose n'engendre pas de réponse inflammatoire (Bousquet 1995).

Au niveau cellulaire, des changements morphologiques tels que la condensation du cytoplasme (Olanow et al. 1999), ainsi que la formation de protubérances au niveau de la membrane plasmique (Nunez et al. 1998) sont observées lors de l'apoptose.

Sur le plan nucléaire, la condensation de la chromatine nucléaire en périphérie du noyau et une fragmentation de l'ADN internucléosomique apparaissent au cours de l'apoptose.

Des changements au niveau des mitochondries sont aussi à noter parmi lesquels un gonflement de l'organite, de même qu'une perte du potentiel de membrane mitochondrial (Mignon 1998). Pourtant, cette dernière caractéristique n'est pas absolument nécessaire pour le déroulement du processus apoptotique (Scaduto et al. 1999).

Enfin, le dernier aspect morphologique est la formation de corps apoptotiques conduisant à l'élimination de la cellule.

Les caractéristiques biochimiques peuvent être classées en deux parties. La première partie concerne toutes les modifications impliquant les mitochondries. La seconde partie fait référence à des changements au niveau cellulaire.

En effet, les mitochondries représentent le point de non-retour, en quelque sorte le commencement de la fin pour la cellule. Un des premiers aspects moléculaires décrit est la

migration des protéines (Bad et Bax) du cytosol vers la membrane des mitochondries. Leur rôle est de contrer l'action anti-apoptotique d'une autre protéine Bcl-2 (une des protéines responsable de la résistance à l'apoptose chez les mammifères).

L'ouverture des mégapores situés au niveau de la membrane mitochondriale faciliterait la libération du cytochrome c et de l'apoptosis-inducing factor (AIF) (Mignon 1998). Ces deux molécules font partie des facteurs qui aboutissent *in fine* à l'activation irréversible d'un tronc commun constitué par des protéases à cystéines appelées caspases. Ces protéines sont capables de cliver une vingtaine de substrats protéiniques à des sites contenant des résidus aspartate, engageant ainsi la phase terminale et irréversible de l'apoptose. Parmi ces substrats, on peut citer la cytokine IL-1 β , l'actine, la fodrine, la poly (ADP-ribose) polymérase, etc. Ce processus aboutit finalement au démantèlement de la cellule et à la formation des corps apoptotiques

II.3: Processus conservé dans l'évolution

L'apoptose a d'abord été découverte chez un ver nématode *Caenorhabditis elegans* (Jacobson et al. 1997). Des études ont permis d'identifier le nombre exact de cellules qui constituent *C. elegans* (1090 cellules). Lors du développement embryonnaire de ce nématode, un nombre bien précis de cellules (131 cellules) meurent par apoptose.

Des analyses génétiques ont révélé 14 gènes appelés Ced (cell death) qui contrôlent l'apoptose. Parmi eux, Ced 3, Ced 4 et Ced 9 jouent un rôle central. Ced 3 et Ced 4 favorisent l'apoptose. Ils sont donc nommés pro-apoptotiques, par contre Ced 9 a une action anti-apoptotique. Ces deux groupes de gènes ont donc des rôles opposés. Afin d'assurer la survie de la cellule, la quantité de protéines anti-apoptotiques est suffisante pour contrer l'action des protéines pro-apoptotiques. En revanche, lorsque la cellule reçoit des signaux apoptotiques, la quantité de protéines favorisant l'apoptose est augmentée. La balance penche alors du côté de la mort cellulaire (Mignon 1998).

Ces trois gènes ont leur homologue dans la régulation de l'apoptose chez les mammifères. Ainsi, Ced 3 et Ced 9 sont des homologues structurels et fonctionnels des gènes ICE (interleukin 1 β converting enzyme ou caspase-1) et de Bcl-2 respectivement. Ced 4 semblerait être l'homologue du gène Apaf-1 (apoptosis protease-activating factor) qui chaperonne et catalyse l'activation des caspases.

II.4: Physiopathologie

Le suicide cellulaire est un phénomène actif où la cellule participe à sa propre destruction. Ce phénomène demande donc une régulation bien particulière. Cependant, les déviances et les dysfonctionnements ne sont pas rares dans le déroulement de ce mécanisme si bien qu'on compte bon nombre de maladies dans lequel ce phénomène est dérégulé.

Ainsi, une apoptose non contrôlée et excessive peut entraîner l'apparition de diverses maladies parmi lesquelles l'anémie aplastique et des maladies neurodégénératives comme les maladies d'Alzheimer, d'Huntington ou de Parkinson (Saikumar et al. 1999).

Une mort cellulaire programmée déficiente est tout aussi grave, puisque les cellules anormales ne sont plus éliminées. Ceci peut mener au développement de cancers comme la leucémie ou au syndrome d'hyperéosinophilie (figure I.5.).

II.5: Les étapes de l'apoptose

L'apoptose est un phénomène divisé en trois phases□

- Déclenchement du signal apoptotique par intégration de signaux intracellulaires et extracellulaires
- Phase de contrôle essentiellement assurée par les mitochondries
- Phase d'exécution où la cellule acquiert ses caractéristiques morphologiques et biochimiques

II.5.1. Phase d'exécution déclenchée par les caspases

Cette phase est une étape commune à toutes les cellules. Elle fait appel à une famille de protéases□les caspases.

A) Caractéristiques et structures des caspases

Les caspases sont des protéases à cystéines qui sont capables de cliver leur substrat après un résidu acide aspartique (May 1998). Elles jouent un rôle essentiel dans l'apoptose

puisque leurs actions vont déboucher sur les caractéristiques morphologiques et biochimiques de l'apoptose.

Dans une cellule au repos, les caspases sont sous forme inactive. Ces précurseurs sont composés de quatre domaines distincts □ un domaine amino-terminal de taille variable (nommé pro-domaine), une grande sous-unité, une petite sous-unité flanquée d'un résidu aspartate et une région linker permettant la liaison des deux sous-unités (Nunez et al. 1998).

L'activation des caspases se fait via un clivage protéolytique entre ces domaines. Le pro-domaine et la région linker sont enlevés tandis que les sous-unités sont assemblées en une enzyme active.

Les caspases actives sont composées de deux hétérodimères interagissant via les petites sous-unités. Elles forment ainsi un tétramère avec deux sites catalytiques. Chaque site est formé d'une séquence d'acides aminés très conservée et est composé d'un résidu cystéine inclus dans une séquence peptidique de type QACRG (Gln, Ala, Cys, Arg, Gly). Cette séquence confère aux caspases une spécificité de reconnaissance et de clivage au niveau de résidus aspartate (Mignon 1998). Les résidus entourant l'aspartate dans les substrats assurent une certaine spécificité des différentes protéases.

Le résidu aspartate peut être présent sur les caspases elles-même. En effet, toutes les caspases existent sous forme de pro-enzymes et doivent être clivées pour devenir actives. Pour certaines caspases, l'activation se fait via le clivage par d'autres protéases à cystéine. Pour d'autres, l'activation est le fait d'un auto-clivage. On peut donc schématiser ce mécanisme en disant que les caspases fonctionnent comme une cascade protéolytique.

Les caspases représentent une famille importante de protéases (numérotées de 1 à 14). Malgré des caractéristiques communes, on peut néanmoins classer les caspases en deux grandes sous-familles □ les caspases initiatrices et les caspases effectrices. Cette classification est basée sur leurs sites d'action dans la cascade de caspases.

Les caspases qui sont activées suite à la présence de signaux pro-apoptotiques sont nommées caspases initiatrices (exemple des caspases-2,-8,-9 et -10) (Saikumar et al. 1999). De plus, la plupart de celles-ci possèdent un grand pro-domaine contenant un motif d'interaction protéine-protéine tel que le "death effector domain" (DED) ou le "caspase activation and recruitment domain" (CARD). Ces motifs assurent la transduction de divers signaux comme ceux initiés par le □ "tumor necrosis factor" (TNF), un facteur pro-apoptotique. Cependant, seules les interactions homotypiques sont permises (exemple □ DED-

DED) alors que des interactions hétérotypiques ne se font pas (DED-CARD) (Kaufmann et al. 2001). Ce mécanisme assure une régulation et un ordre bien précis des événements menant au processus de mort cellulaire (figure I.6.).

Les caspases-3,-6 et -7 sont appelées caspases effectrices. Elles possèdent un court pro-domaine et ne sont pas capables d'auto-activation. Elles dépendent donc des caspases initiatrices (Kaufmann et al. 2001) pour leur activation. Ces caspases ont pour rôle de cliver différents substrats.

B) Rôles des différentes caspases

Toutes les caspases ne sont pas impliquées dans l'apoptose et ne jouent pas le même rôle (Saikumar et al. 1999).

La caspase-1 ou ICE permet la maturation de la cytokine IL-1 β . La caspase-3 joue un rôle essentiel dans l'apoptose entre autres en initiant la formation des corps apoptotiques, la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN (Saikumar et al. 1999). La caspase-9 est une caspase initiatrice importante dans le développement neuronal (Saikumar et al. 1999).

Ces exemples montrent que l'activation des caspases n'aboutit pas forcément à la mort cellulaire (Mignon 1998).

C) Substrats des caspases

Les caspases ont pour rôle de cliver d'autres protéines. Ce clivage protéolytique mène soit à une activation de protéines impliquées dans l'apoptose, soit à l'inactivation de protéines impliquées dans la structuration de la cellule ou la réparation de l'ADN (Mignon 1998)

Ainsi, on peut citer l'activation par les caspases d'endonucléases telles que le DFF (DNA fragmentation factor) qui clive l'ADN en fragments de 180 pb ou un multiple de 180 pb et d'autres pro-caspases. Un autre exemple est le processus d'activation de "caspase-activated deoxyribonuclease" (CAD). CAD est une endonucléase constitutive présente dans le noyau des cellules (Kaufmann et al. 2001). Cette protéine est maintenue inactive par des

inhibiteurs □ ICAD (inhibitor of CAD). En condition apoptotique, la caspase-9 active provoque des dommages aux pores nucléaires selon un mécanisme encore inconnu. Ceci permet l'entrée dans le noyau de la caspase-3. Celle-ci clive les inhibiteurs de CAD. CAD est alors libéré et peut entamer la digestion apoptotique de la chromatine.

Les caspases inactivent des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN comme la poly (ADP-ribose) polymérase, PARP (Huang et al. 1999). Les caspases vont également couper les lamines nucléaires. Ces protéines de structure forment un soutien autour de l'enveloppe nucléaire. Elles jouent un rôle central dans la régulation de la vésicularisation et la formation des membranes nucléaires. De plus, l'inactivation de protéines du cytosquelette telles que l'actine et la fodrine permet aussi de démanteler la cellule et de favoriser la formation de vésicules apoptotiques. L'action d'autres enzymes impliquées dans la maturation de l'ARN sera aussi inhibée. De cette manière, la cellule évite de gaspiller de l'énergie puisque ces enzymes utilisent beaucoup d'ATP. Cette énergie économisée servira à la formation des vésicules apoptotiques.

D) Apoptosome

Le processus de recrutement des caspases permet la formation d'un complexe nommé apoptosome. Sa formation résulte de l'aggrégation de pro-caspases ayant des domaines d'interaction protéine-protéine. Cette aggrégation est la conséquence de la présence dans le cytosol de la cellule de protéines libérées par les mitochondries tels que le cytochrome c et Apoptosis-inducing factor (AIF) (figure I.7).

Les mitochondries ont un rôle critique dans le processus apoptotique. Nous détaillerons par la suite l'importance des mitochondries au cours de l'apoptose.

II.5.2. Phase de contrôle

II.5.2.1. Les mitochondries

A) Histologie

La seconde étape concerne essentiellement les mitochondries. Les mitochondries sont des organelles composées de différents compartiments □ la matrice entourée de la membrane

mitochondriale interne et l'espace intermembranaire délimité par la membrane mitochondriale externe.

La membrane mitochondriale interne contient les complexes protéiniques de la chaîne de transport d'électrons, l'ATP synthase et l'adénine nucléotie translocase (ANT). Les complexes I, II et IV formant la chaîne respiratoire mitochondriale pompent les protons de la matrice à travers la membrane mitochondriale interne en utilisant l'énergie des électrons fournis par la nicotinamide adénine dinucléotide (NADH), l'ubiquinone et le cytochrome c. Ce mécanisme se reflète sous forme de potentiel de membrane mitochondrial.

La membrane mitochondriale externe contient principalement des canaux anioniques voltage-dépendant (VDAC).

B) Physiopathologie

En condition pathologique, les mitochondries vont subir différents changements qui mènent à la phase d'exécution de l'apoptose. Le mécanisme impliqué est une perméabilisation membranaire des mitochondries (Kroemer et al. 2000).

La perméabilisation de la membrane externe permet la libération de protéines qui sont emprisonnées dans l'espace intermembranaire telles que le cytochrome c, certaines pro-caspases et l'apoptosis-inducing factor (AIF). La perméabilisation de la membrane interne ne provoque pas une libération massive des protéines matricielles, mais se marque par une dissipation du gradient de protons responsable du potentiel de membrane mitochondrial. De plus, de petits solutés comme le sucrose ou l'eau vont s'accumuler dans la matrice menant à un gonflement des mitochondries.

Le mécanisme de perméabilisation membranaire peut être divisé en trois étapes□ l'initiation, la décision et la dégradation (figure I.8.) [Kroemer, 2000]. Durant la première phase (l'initiation), les cellules accumulent diverses molécules de toutes sortes qui agissent directement sur les mitochondries et qui vont induire la perméabilisation membranaire des mitochondries. La seconde étape est la perméabilisation proprement dite. Celle-ci mène finalement à la perte irréversible des fonctions cellulaires (phase de dégradation).

a. phase d'initiation

Les molécules qui déclenchent cette perméabilisation sont appelées molécules pro-apoptotiques. Cela regroupe essentiellement les membres de la famille des protéines Bcl-2 (décrite plus loin). Cette famille de protéines joue un rôle primordial dans la régulation de la mort cellulaire et la survie de la cellule. Des protéines telles que Bax, Bad, Bid, Bak et Bim favorisent la mort cellulaire alors que d'autres comme Bcl-2 ou Mcl-1 s'opposent à cette mort.

Les membres de cette famille sont sous forme homo- et hétéro-dimères. La balance entre les protéines anti- et pro-apoptotiques régule la mort cellulaire (voir plus loin) (Bossy-Wetzel et al. 1999). Le mécanisme par lequel la famille de protéines Bcl-2 assure la survie ou la mort de la cellule n'est pas clair, mais il peut être lié à la fois à la capacité qu'ont ces protéines de former un canal ionique et à celle de former des complexes avec d'autres protéines (voir plus loin).

b. phase de décision

Ces différentes molécules ont pour conséquence la perméabilisation membranaire mitochondriale. Cette seconde étape (la décision) est caractérisée notamment par une réduction du potentiel de membrane mitochondrial. Quatre modèles ont été proposés [Kroemer, 2000] afin d'expliquer le processus de perméabilisation.

Le premier modèle concerne la formation d'un pore non spécifique à travers la membrane mitochondriale interne par l'adénine nucleotide translocator (ANT). Cette formation résulterait de la présence de molécules pro-apoptotiques comme le calcium ou des thiols oxydants. Le second modèle propose la formation d'un pore via les VDAC, canal anionique voltage dépendant, au niveau de la membrane mitochondriale externe. Le troisième modèle fait intervenir l'oligomère Bax qui pourrait, suite à un changement de conformation, former un canal à travers la membrane mitochondriale externe. Dans le dernier modèle, VDAC et Bcl-2 agiraient de concert afin de provoquer la perméabilisation membranaire. Ces différents modèles n'expliquent qu'une partie du phénomène. Car, en fait, lors d'une perméabilisation ce sont à la fois la membrane mitochondriale interne et externe qui sont touchées. Les diverses protéines impliquées pourraient peut-être être regroupées sous un seul complexe nommé "permeability transition pore complex" (PTPC) ou mégapore.

L'ouverture de ces mégapores permet la libération passive du cytochrome c dans le cytosol de la cellule. Cette ouverture peut être mesurée expérimentalement par une perte du potentiel de membrane mitochondrial. Cependant, la libération du cytochrome c peut être

observée en absence ou avant la perte du potentiel de membrane mitochondrial. Cela suggère que l'ouverture des mégapores n'est pas responsable de la libération du cytochrome c. Il a été montré que l'ouverture des mégapores pourrait être une conséquence de l'activité des caspases. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs des caspases prévient la perte du potentiel de membrane mitochondrial mais pas la libération du cytochrome c. Donc, les caspases actives agiraient en amont de l'ouverture du PTPC mais en aval de la libération du cytochrome c (Bossy-Wetzel et al. 1999). En favorisant l'ouverture des mégapores, les caspases amplifient le système de mort cellulaire.

La libération du cytochrome c serait médiée par un autre mécanisme. L'hypothèse proposée est la formation d'un canal à travers la membrane mitochondriale externe. Des analyses de structures de protéines ont permis d'identifier un candidat potentiel □ Bax qui est une protéine pro-apoptotique de la famille de Bcl-2. Cette protéine pourrait agir seule ou interagir avec les mégapores et favoriser leur ouverture.

c. phase de dégradation

Le cytochrome c et les autres molécules pro-apoptotiques libérés par des mécanismes encore incertains vont déclencher l'aggrégation des caspases en un complexe appelé apoptosome. Dans le cytosol, le cytochrome c peut se lier à Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor). Cette protéine joue un rôle important dans la formation de l'apoptosome.

Apaf-1 est constitué entre autres de séquences répétées WD-40 (figure I.9.) (Jacobson et al. 1997) à son extrémité C-terminale. Ces séquences pourraient jouer un rôle d'inhibition de la fonction de Apaf-1 en interagissant avec le domaine N-terminal de la protéine (Nunez et al. 1998). L'activation de Apaf-1 peut être induite par un changement de conformation suite à la liaison du cytochrome c et/ou de l'ATP. Ce changement mène à la disruption de l'interaction entre les domaines WD-40 et N-terminal. On favorise ainsi l'oligomérisation de la protéine et on expose de cette manière un domaine d'interaction protéine-protéine (CARD) du côté N-terminal de Apaf-1. Or, la pro-caspase 9 possède le même domaine d'interaction protéine-protéine (CARD). Des interactions homotypiques peuvent donc se produire. On aboutit ainsi à la formation d'un complexe macromoléculaire, l'apoptosome.

Une autre molécule libérée suite à l'ouverture des mégapores est l'apoptosis inducing factor (AIF) (Kaufmann et al. 2001). Ce polypeptide a la capacité d'induire la condensation de la chromatine indépendamment de l'action des caspases ainsi que la fragmentation de

l'ADN. Des questions sur le rôle exact et le mécanisme d'action de AIF restent néanmoins sans réponse.

Outre AIF, l'espace intermembranaire peut aussi renfermer une endonucléase G qui pourrait, une fois libérée, être responsable de la fragmentation de l'ADN. De nouveau, peu de données concernant ce polypeptide ont été publiées.

Un troisième exemple de molécule libérée par les mitochondries durant l'apoptose est la protéine "second mitochondrial activator of caspase", SMAC ou Diablo. Son rôle est de faciliter l'activation des caspases en inactivant certains inhibiteurs de protéines impliqués dans l'apoptose appelés inhibitor of apoptosis protein (IAP). Ces IAP inhibent les caspases-3, -7 et -9.

II.5.2.2. La famille de protéines de type Bcl-2

A) Description de la famille de protéines type Bcl-2

La famille de protéines de type Bcl-2 représente un acteur important dans le déroulement du processus apoptotique. En effet, ces protéines participent à la régulation de la survie et de la mort de la cellule. Cependant, au sein de cette famille, deux grands groupes se distinguent et ont des actions opposées□ on retrouve des protéines anti-apoptotiques favorisant la survie de la cellule et des protéines pro-apoptotiques initiant le suicide de la cellule (Bousquet 1995) (figure I.10.).

Ces protéines partagent des régions communes désignées comme BH (pour Bcl-2 Homology) (Kelekar et al. 1998). Quatre domaines ont pu être identifiés□BH1, BH2, BH3 et BH4 (figure I.11.).

Cependant, ces quatre domaines ne sont pas présents dans tous les membres de cette famille. Il manque parfois l'un ou l'autre domaine. Cette caractéristique a été utilisée afin d'établir une sous-classification.

Certaines protéines telles que Bad, Bid et Bim ne possèdent que le domaine BH3 (Reed 1998). La plupart d'entre elles sont caractérisées par une séquence transmembranaire à leur extrémité C-terminale. Ce domaine leur permet de s'insérer dans les membranes biologiques telles que la membrane mitochondriale externe, la membrane du réticulum endoplasmique ou l'enveloppe nucléaire externe. Cependant, Bad et Bid, deux protéines pro-apoptotiques n'ont pas ce domaine transmembranaire. Ces protéines diffusent alors dans le cytosol de la cellule ou interagissent avec d'autres protéines de la famille Bcl-2 comme Bcl-xl ou Bcl-2. Dans ce

dernier cas, Bad ou Bid enclenche les premières étapes de l'apoptose. La régulation de l'activité de Bad passe par une phosphorylation par diverses kinases dont Akt (figure I.12.). La forme phosphorylée de Bad n'est pas capable d'interagir avec Bcl-2. De cette manière, les facteurs de croissance (comme interleukine-3) assurent la survie de la cellule en inhibant les processus de mort cellulaire (voir plus loin).

L'activité de la protéine Bid est régulée par la caspase-8. Le clivage de Bid par la caspase-8 mène à l'exposition d'une région hydrophobe de BH3. Cette région est impliquée dans la dimérisation avec d'autres protéines au niveau de la membrane mitochondriale externe.

B) Structure et rôle des différents domaines

a. domaines BH1 et BH2

Les domaines BH1 et BH2 sont principalement présents dans les protéines anti-apoptotiques excepté pour Bax et Bak qui sont pro-apoptotiques. Ces régions sont essentielles à la fonction de survie de la cellule et à l'interaction avec d'autres protéines telles que Bax et Bak. Ces protéines peuvent s'insérer dans une bicouche lipidique et former un canal ionique.

Dans le cas de protéines anti-apoptotiques, le canal formé aide à maintenir le potentiel de membrane mitochondrial et empêcher la libération du cytochrome c et le gonflement de la mitochondrie. Dans le cas d'interactions homotypiques de protéines pro-apoptotiques (Bax/Bax), le canal formé favorise la libération du cytochrome c et probablement la disruption du potentiel de membrane mitochondrial.

b. domaine BH3

Le domaine BH3 est critique pour la dimérisation et favorise la mort de la cellule (Kelekar et al. 1998) (figure I.11.). Au sein des membres pro-apoptotiques, trois classes de protéines peuvent être distinguées. Ces trois classes se basent sur la structure et l'organisation des domaines.

La classe I comprend des protéines qui ressemblent à Bcl-2 avec un domaine BH1, BH2, BH3 et un domaine transmembranaire. Lorsque ces protéines Bax ou Bak interagissent avec Bcl-2 ou Bcl-xl, l'apoptose n'est pas enclenchée et la cellule survie. Lorsque Bax interagit avec un autre membre de la même famille (interaction homotypique \square Bax/Bax), le

processus apoptotique est mis en place et la cellule meurt (Bousquet 1995) (figure I.13.). La cellule prend telle ou telle voie en jouant sur la capacité de former plus souvent des hétérodimères anti-apoptotiques Bcl-2/Bax ou plus souvent des homodimères pro-apoptotiques Bax/Bax.

Les classes II et III ne possèdent pas les domaines BH1 et BH2. Les membres de la classe II sont aussi caractérisés par la présence d'un domaine transmembranaire, ce qui n'est pas le cas pour les membres de la classe III tels que Bad ou Bid (voir ci-dessus).□

c. Formation d'un dimère

L'observation du domaine BH3 permet d'expliquer la formation d'un dimère. Ce domaine forme une hélice α amphipatique qui lie avec une forte affinité une poche hydrophobe créée par les domaines BH1, BH2 et BH3 d'un autre partenaire. Les interactions sont autant des interactions hydrophobes qu'électrostatiques. Cependant, les forces d'interaction ne sont pas les mêmes selon les différents partenaires. Ainsi, Bad dimérise plus facilement et est capable de déplacer l'un des partenaires tel que Bax du complexe protéinique Bax/Bcl-2. On passe finalement d'un phénotype anti-apoptotique à un phénotype pro-apoptotique.

Les protéines qui contiennent uniquement un domaine BH3 (comme Bad, Bid) peuvent lier la poche hydrophobe des protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xl). Or, ces protéines anti-apoptotiques agissent comme un canal ionique afin de maintenir l'homéostasie mitochondriale. Lors d'une interaction pro- ou anti-apoptotique, la fonction du canal peut être inhibée ou modifiée. Cela entraîne un déséquilibre au niveau de l'intégrité membranaire mitochondriale. De plus, l'affinité de liaison de Bad pour Bcl-2 est plus grande que celle de Bax pour Bcl-2. Il y a donc un déplacement de partenaire. Au lieu de former un hétérodimère anti-apoptotique (Bax/Bcl-2), on obtient un hétérodimère pro-apoptotique (Bad/Bcl-2). A cela s'ajoute la formation d'un canal homodimère Bax/Bax dont la fonction est le déclenchement de l'apoptose.

C) Régulation des protéines de la famille de Bcl-2

Si les protéines Bcl-2, Bcl-xl sont désignées comme anti-apoptotiques, c'est parce qu'elles empêchent la libération du cytochrome c maintenu dans l'espace intermembranaire des mitochondries. Cette libération est le point de non-retour. Au delà, les autres événements (formation de l'apoptosome, activation de la cascade de caspases) s'enchaînent sans pouvoir contrôler l'une ou l'autre étape. La régulation de l'apoptose doit donc s'effectuer en amont de cette étape irréversible.

Outre des interactions avec des membres de la famille Bcl-2, ces protéines peuvent aussi interagir avec d'autres partenaires. Bcl-xl, par exemple, est capable de se lier à Apaf-1 (polypeptide impliqué dans la formation de l'apoptosome). Il en résulte une inhibition de l'action de Apaf-1 et la non-activation de la pro-caspase-9. Cependant, le mécanisme par lequel Bcl-xl pourrait agir reste encore inconnu (Reed 1998).

Un autre exemple plus complexe est l'interaction des membres de la famille Bcl-2 avec les mégapores, en particulier le canal anionique voltage-dépendant (VDAC) situé au niveau de la membrane mitochondriale externe. Les conséquences de l'interaction seront fonction du type de protéines. En effet, si une protéine anti-apoptotique (Bcl-2) se lie à VDAC, l'activité du canal est maintenue. A l'inverse, si une protéine pro-apoptotique (Bax) se lie à VDAC, un profond changement de conformation du canal peut se produire et l'ouverture a pour conséquence la perte du potentiel de membrane mitochondrial, le gonflement de l'organelle, voir la libération du cytochrome c.

D) Résumé des actions de la famille des protéines Bcl-2

En résumé, la famille de protéine Bcl-2 comprend plusieurs membres qui sont classés selon leur fonction (pro- ou anti-apoptotique). De plus, leurs actions sont multiples et dépendent principalement du partenaire d'interaction (Hengartner 2000). On peut néanmoins résumer leurs rôles en quelques points (figure I.14)

- 1) La formation d'un canal à travers la membrane mitochondriale externe permettant la libération du cytochrome c
=> action pro-apoptotique (de Bax par exemple)
- 2) Interaction hétérotypique de Bcl-2/Bax
=> action anti-apoptotique
- 3) Liaison de Bcl-xl avec l'un des partenaires de l'apoptosome, Apaf-1
=> action anti-apoptotique

4) Interaction avec le canal voltage dépendant des mégapores

⇒ action anti-apoptotique si Bcl-2 présent

⇒ action pro-apoptotique si Bax présent

Différents mécanismes permettent de mettre en place le processus menant à l'apoptose. La plupart utilisent les mitochondries et les protéines de la famille Bcl-2 pour activer les caspases. Cependant, d'autres passent par des interactions ligand-récepteur pour ensuite activer les protéases à cystéine parfois de manière indépendante des mitochondries. Dans la suite de cette introduction, nous passerons en revue les différents signaux déclencheurs de l'apoptose.

II.5.3. Déclenchement de l'apoptose □ signaux pro-apoptotiques

Le programme de mort cellulaire est un processus complexe, mais un schéma général peut néanmoins être dégagé. L'intégration par la cellule de signaux potentiellement apoptotiques se fait via une interaction ligand-récepteur. Cette interaction est ensuite traduite via une protéine adaptatrice puis transmise aux caspases initiateuses. A ce stade, la cellule ne peut plus revenir en arrière. C'est le commencement de l'exécution. Par la suite, les caspases effectrices sont activées et il s'en suit la désintégration de la structure cellulaire.

Trois mécanismes principaux d'activation des caspases ont été découverts (Dragovich et al. 1998) (figure I.15.) au niveau physiologique. Le retrait des facteurs de croissance représente le premier processus. Il en résulte la libération du cytochrome c, l'activation de Apaf-1 et le déclenchement de la cascade de caspases. Le second mécanisme est initié par la présence de récepteurs en surface de la cellule tels que Fas ou TNFR (tumor necrosis factor receptor). Suite à une transduction du signal, les caspases sont activées. Le troisième processus peut être déclenché par des dommages à l'ADN et fait intervenir des protéines telles p53.

III.5.3.1. Le retrait des facteurs de croissance

La décision d'initier ou non le programme de mort cellulaire est à l'image d'une balance. Chaque plateau de la balance contient le résultat de l'intégration de signaux négatifs ou positifs. L'équilibre entre ces plateaux permet d'assurer les fonctions vitales de la cellule.

Si l'ensemble des signaux positifs est inférieur à ceux des signaux négatifs, la cellule entame le programme de mort cellulaire. Dans le cas contraire, l'intégration des signaux aboutit à la prolifération cellulaire.

La présence de facteurs de croissance (fibroblast growth factor, platelet derived growth factor, interleukine-3) se traduit par une interaction ligand/récepteur puis une transduction du signal passant par l'activation de voies telles que celles dépendant des MAP kinases ou de la Pi-3 kinase/Akt. Le rôle physiologique est la différenciation et/ou la prolifération.

Pour que la prolifération se passe d'autant mieux, les processus apoptotiques sont inhibés. En vertu du principe de parcimonie, la cellule utilise des mécanismes déjà présents. En ce sens que Akt activé par la voie des Pi-3 kinases est capable d'inhiber des protéines pro-apoptotiques comme Bad (King et al. 2001). Bad phosphorylé ne forme pas d'hétérodimères pro-apoptotiques avec Bcl-2. L'apoptose n'est donc pas enclenchée.

En revanche, en absence de facteurs de croissance, Akt n'est pas activée. Bad n'est donc plus phosphorylé. Il va alors s'associer à Bcl-2 et inhiber son action anti-apoptotique. Dans ce cas, les premières étapes de l'apoptose se mettent en place conduisant à la mort de la cellule.

III.5.3.2. L'interaction avec des récepteurs nommés death receptor

Alors que dans le cas précédent, la présence du ligand (facteur de croissance) inhibe l'apoptose, dans ce cas-ci, l'interaction récepteur/ligand aura pour conséquence le déroulement de l'apoptose. Deux cas de figure sont envisagés.

A) Tumor necrosis factor (TNF- α)

Le TNF est une cytokine dont un des rôles est de cibler et de tuer les cellules cancéreuses et/ou infectées par un virus. Le récepteur de cette cytokine (TNFR) contient une séquence intracellulaire conservée appelée "death domain" (DD). Lorsque le TNF se lie à son récepteur, celui-ci se trimérise. Il s'en suit une transduction du signal. En effet, ce domaine "death domain" peut interagir avec une autre protéine qui possède elle-même un "death

domain". Cette molécule adaptatrice est appelée TRADD (TNFR-associated death domain protein). Cette molécule va elle-même interagir avec une autre protéine nommée FADD (Fas-associated death domain protein) via une liaison homotypique "death domain/ death domain". FADD interagit à son tour avec la pro-caspase-8. Cette interaction a pour conséquence l'activation de cette protéase à cystéine et donc l'initiation de la cascade de caspases. De plus, la caspase-8 clive Bid (molécule pro-apoptotique) qui devient alors actif et se lie à la mitochondrie. Cela induit la libération du cytochrome c qui est capable d'amplifier l'apoptose.

Cependant, le TNF est capable d'activer des molécules qui vont promouvoir la survie de la cellule (Saikumar et al. 1999). TRADD peut interagir avec d'autres molécules qui par la suite vont activer le facteur de transcription, NF κ B (nuclear factor κ B). NF κ B augmente l'expression des gènes de survie.

C'est le contexte cellulaire qui favorise telle ou telle voie. Le mécanisme impliqué dans ce choix n'est cependant pas encore connu. Par contre, le rôle physiologique d'un tel mécanisme de contrôle pourrait être d'empêcher une prolifération excessive des cellules (Dragovich et al. 1998).

B) Lymphocyte T

Les lymphocytes possèdent un moyen bien spécifique pour induire l'apoptose de cellules infectées par un virus. Celles-ci présentent en surface des antigènes viraux reconnus par un lymphocyte. En parallèle, il y a un autre système de récepteur/contre-récepteur. Toutes les cellules ont un trimère de molécules membranaires Fas. Les lymphocytes possèdent le contre-récepteur κ Fas ligand (figure I.16.).

Fas ligand est une protéine transmembranaire qui induit l'apoptose en se liant à Fas. Fas est un récepteur transmembranaire glycosylé. Par le même mécanisme d'interaction homotypique de domaines "death domain" que celui décrit pour TNFR, lorsque Fas se lie à son ligand, on aboutit à l'activation de caspases menant à la dégradation de différents substrats et à la mort de la cellule (Nunez et al. 1998).

De plus, le lymphocyte possède des petites vésicules qui vont libérer la perforine et le granzyme B. La perforine, comme son nom l'indique, provoque des trous dans la membrane de la cellule infectée afin de permettre l'entrée du granzyme B. Cette protéine est une sorte de

caspase qui aide à l'apoptose car elle clive des protéines après un résidu aspartate et active une ou plusieurs protéases comme les caspases-2, -3, -7, -8 et -10 (Saikumar et al. 1999). Par ailleurs, le granzyme B est capable de cliver la protéine pro-apoptotique Bid (Kaufmann et al. 2001).

Outre le rôle des lymphocytes T dans l'élimination de cellules infectées par un virus, ces systèmes Fas/Fas ligand et perforine/granzyme B permettent aussi de maintenir une population cellulaire de défense en éliminant les lymphocytes auto-réactifs.

C) Les facteurs nucléaires impliqués dans l'apoptose

En plus de facteurs extracellulaires, l'apoptose peut être déclenchée en réponse à des signaux internes tels que les dommages à l'ADN. Lorsque ces altérations génétiques sont présentes, la cellule arrête son cycle et induit l'apoptose. Le gène suppresseur de tumeur p53 est impliqué dans la préservation du patrimoine génétique. Ainsi, p53 agit en deux temps : il arrête le cycle cellulaire. Pendant ce temps, les réparations nécessaires de l'ADN sont effectuées. Cependant, dans le cas où les réparations ne sont pas possibles, p53 peut aussi déclencher l'apoptose. p53 est un facteur de transcription qui est capable d'augmenter la transcription du gène Bax. La quantité de produit de ce gène Bax augmente, ce qui favorise la formation d'homodimères pro-apoptotiques au niveau des mitochondries. Par conséquent, il y a libération du cytochrome C et induction de l'apoptose (Dragovich et al. 1998).

II.5.4. Conclusion

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un processus très bien régulé. Trois étapes ont été mises en évidence : l'intégration des signaux pro-apoptotiques, une phase de contrôle et une phase d'exécution. Durant la phase de contrôle, les mitochondries jouent un rôle central et représente le carrefour décisionnel. Il convient donc de revoir le rôle physiologique des mitochondries au sein des cellules.

III.MITOCHONDRIES

III.1. Histologie des mitochondries

Les mitochondries sont des organelles mesurant habituellement 0,5 à 2 microns de long. Elles sont le site principale de la production d'énergie dans la cellule. Chaque mitochondrie est constituée de deux membranes, l'une externe et l'autre interne. La membrane externe entoure complètement la mitochondrie, par contre la membrane interne forme des plis ou invaginations appelées crêtes. Les replis permettent d'augmenter la surface nécessaire à la respiration aérobie. Ces deux membranes délimitent deux compartiments, l'un au centre de la mitochondrie, la matrice et l'autre entre la membrane externe et la membrane interne, l'espace intermembranaire.

III.1.1. Propriétés des membranes mitochondriales

Les membranes mitochondriales ont des propriétés très différentes. La membrane mitochondriale externe contient des porines. Ces protéines intrinsèques forment de grands canaux membranaires non sélectifs. Grâce à ces porines, la membrane externe est particulièrement perméable et permet à des molécules atteignant 10 kDaltons de passer librement dans l'espace intermembranaire. De ce fait, l'espace intermembranaire est en continuité avec le cytosol de la cellule.

Au contraire, la membrane interne est très imperméable, pratiquement toutes les molécules et les ions ont besoin de transporteurs spécifiques situés en membrane interne pour accéder à la matrice. La membrane interne est très peu perméable aux petits ions, à cause d'une forte concentration en cardiolipide, un phospholipide. Cette membrane contient également les différents complexes formant la chaîne de transport d'électrons, l'ATP synthase ainsi que l'adénine nucléotide translocase (ANT).

III.1.2. La matrice mitochondriale

La matrice contient des ribosomes et des molécules d'ADN circulaire double-brin. De plus, la matrice est aussi une réserve de calcium. Le calcium est stocké sous forme de

précipité de phosphate de calcium. Cependant, le rôle des mitochondries dans la régulation de la concentration cytoplasmique de cet ion reste controversé.

III.1.3. Le génome mitochondrial

Les mitochondries possèdent leur propre matériel génétique. Cet ADN circulaire double-brin se trouve dans la matrice. Il encode 13 polypeptides mitochondriaux de la chaîne de transport d'électrons. Parmi ces polypeptides, on dénombre 7 sous-unités du complexe I de la chaîne de transport d'électrons, le cytochrome b du complexe III, 3 sous-unités du complexe IV et 2 sous-unités du complexe V (Schapira 1998) (figure I.17.)

Ces polypeptides interagissent avec d'autres protéines encodées dans le noyau et importées dans les mitochondries par un système de transport spécialisé. De plus, afin d'assurer la transcription, l'ADN mitochondrial encode aussi 22 ARN de transfert et 2 ARN ribosomiaux.

III.2 Fonctions mitochondriales

En plus de fournir de l'énergie à la cellule, les mitochondries participent à différentes voies du métabolisme. Ainsi, l'oxydation des acides gras se passe essentiellement au niveau de la membrane externe. Une partie du métabolisme des glucides se déroule au sein des mitochondries. Ces organites pourraient jouer un rôle dans la régulation du taux de calcium (Sherer et al. 2001). Un dernier rôle majeur est l'implication des mitochondries dans le processus apoptotique (Wallace 2001).

Les mitochondries sont la source principale d'énergie pour la cellule. Cette énergie se trouve principalement sous forme d'ATP. La synthèse d'ATP peut se faire selon trois voies : la phosphorylation de substrats, la phosphorylation oxydative et la glycolyse.

Dans la suite de cette introduction, seule la phosphorylation oxydative sera détaillée.

III.3 Phosphorylation oxydative

La phosphorylation oxydative résulte du couplage de la chaîne de transporteurs d'électrons qui permet l'établissement du gradient électrochimique transmembranaire et de l'activité de l'ATP synthase qui utilise ce gradient de protons pour produire de l'ATP. Le

transfert d'électrons se fait via quatre complexes enzymatiques situés dans la membrane mitochondriale interne.

Les électrons sont transportés entre ces complexes par deux transporteurs mobiles, l'ubiquinone et le cytochrome c. Chaque fois qu'un complexe de la chaîne accepte puis cède des électrons, des protons sont prélevés dans la matrice et transportés dans l'espace intermembranaire. Cette force protomotrice ainsi créée servira à renvoyer les protons à travers la membrane mitochondriale interne via l'ATP synthase. Celle-ci utilise l'énergie du flux de protons pour produire de l'ATP (figure I.18.).

III.3.1. La chaîne de transport d'électrons

Le NADH formé dans la matrice transfère ses électrons à d'autres transporteurs insérés en membrane interne. La chaîne de transport d'électrons est composée d'une vingtaine de transporteurs qui peuvent exister sous deux états différents □ un état oxydé et un état réduit.

Chaque transporteur est réduit lorsqu'il reçoit des électrons d'un transporteur précédent. Il retourne à un état oxydé quand il cède à son tour l'électron à un transporteur qui le suit. Les électrons passent d'un transporteur à un autre jusqu'à l'accepteur final, l'O₂ qui est alors réduit en H₂O.

A) Types de transporteurs

La chaîne de transport d'électrons de la membrane mitochondriale interne est composée de quatre types de transporteurs d'électrons.

Les flavoprotéines sont des polypeptides liés à des groupements prosthétiques comme la flavine adénine dinucléotide (FAD) ou la flavine mononucléotide (FMN). Ils sont capables d'accepter et de céder deux protons et deux électrons.

Les cytochromes sont des protéines contenant un groupement hème. L'atome de fer au centre d'un hème subit des changements réversibles entre deux états d'oxydation Fe³⁺ et Fe²⁺ suite à l'acceptation et à la perte d'un seul électron.

L'ubiquinone (UQ ou coenzyme Q) est une molécule liposoluble capable d'accepter et de céder deux électrons et deux protons.

Dans les protéines fer-soufre, le fer est étroitement lié à des atomes de soufre et constitue un centre fer-soufre. Les centres les plus communs contiennent soit deux, soit quatre atomes de fer et de soufre avec une liaison à des protéines par des résidus cystéines.

B) Complexe de transport d'électrons

Les différents complexes sont profondément ancrés dans la membrane mitochondriale interne. Par contre, le cytochrome c et l'ubiquinone sont indépendants de la membrane. L'ubiquinone diffuse au sein de la bicouche lipidique. Le cytochrome c est une protéine membranaire périphérique située du côté de l'espace intermembranaire. Ces deux transporteurs migrent entre les complexes quasi immobiles et véhiculent de cette manière les électrons d'un complexe à l'autre (figure I.18.).

Si le donneur d'électrons est le NADH, ceux-ci entrent dans la chaîne respiratoire par le complexe I qui les transfère à l'ubiquinone. Si FADH_2 est le donneur d'électrons, les électrons passent par le complexe II avant d'être repris par l'ubiquinone.

Le passage des électrons à travers les différents complexes I, III et IV provoque une libération importante d'énergie. Cette énergie permet le transport de protons qui sont pompés de la matrice vers l'espace intermembranaire. Le transfert de protons par ces complexes établit le gradient protonique qui actionne la synthèse d'ATP.

C) Caractéristiques de chaque complexe de la chaîne respiratoire

a. Complexe I, $\text{NADH} \rightarrow \text{CoQ}$ réductase

La fonction principale de ce complexe est de transférer les électrons du NADH à l'ubiquinone (Triepels et al. 2001). De plus, des protons sont pompés passant de la matrice mitochondriale à l'espace intermembranaire.

Ce complexe est énorme, car il contient plus de 30 polypeptides. Il comprend au moins 9 centres fer-soufre et une flavoprotéine (des transporteurs d'électrons). La majorité de ces sous-unités sont encodées par le génome nucléaire. Sept de ces sous-unités sont encodées par le génome mitochondrial. Ce complexe est le plus important en taille de la membrane mitochondriale interne (850 kDa).

Le complexe I contient trois fractions différentes. La fraction flavoprotéine (FP) et la fraction fer-soufre (IP) sont toutes les deux solubles et représentent la partie périphérique. Par contre, la fraction hydrophobe (HP) est la fraction insoluble ancrée au niveau de la membrane mitochondriale interne.

Chaque fraction est constituée de plusieurs sous-unités. Toutes sont encodées par le génome nucléaire excepté 7 sous-unités de la fraction hydrophobe (HP) qui sont encodées par le génome mitochondrial.

Le transfert d'électrons à travers le complexe I commence au niveau de la fraction flavoprotéine (FP). Cette fraction contient un site de liaison pour le NADH et un groupement flavine mononucléotide (FMN) qui est capable d'accepter des électrons venant de l'oxydation du NADH. Ensuite, les centres fer-soufre de la fraction IP (iron protein) véhiculent les électrons de la fraction flavoprotéine vers la fraction hydrophobe. Cette fraction contient un site de liaison à l'ubiquinone. De plus, cette fraction assure le passage de protons à travers la membrane mitochondriale interne. Cependant, le mécanisme exact de ce passage reste peu connu (figure I.19.).

b. Complexe II, succinate-ubiquinone oxydoréductase

Ce complexe est localisé du côté matriciel de la membrane mitochondriale interne et ne traverse pas la bicouche. Le complexe II est composé de plusieurs polypeptides dont deux forment la succinate déshydrogénase (Parker et al. 1994) qui contient le FAD (une flavoprotéine). Cette enzyme intervient aussi dans le cycle des acides tricarboxyliques.

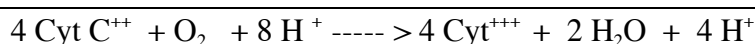
Le complexe II permet le passage d'électrons de faible énergie du succinate au FAD, puis à l'ubiquinone. Le transfert d'électrons par le complexe II n'est pas accompagné d'un transfert de protons.

c. Complexe III, ubiquinol-cytochrome c réductase

Le complexe III catalyse le transfert d'électrons de l'ubiquinol (forme réduite de l'ubiquinone) au cytochrome c. Ce complexe III possède plusieurs groupements hème et un centre fer-soufre responsable du transfert d'électrons. De plus, ce complexe permet le passage de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire.

d. Complexe IV, cytochrome c oxydase

La cytochrome c oxydase catalyse l'oxydation à un électron de 4 molécules de cytochrome c réduits et la réduction à 4 électrons d'une molécule H_2O , c'est-à-dire que la cytochrome c oxydase enlève un électron du cytochrome c par contre, il faut 4 électrons pour réduire une molécule d' O_2 en H_2O .



Ce complexe IV se trouve dans la membrane sous forme de dimère. Il est composé de 13 sous-unités. Les sous-unités I, II et III sont encodées par le génome mitochondrial. Ils contiennent également des centres redox assurant le passage des électrons jusqu'à la molécule d' O_2 , accepteur final de la chaîne de transport d'électrons (Voet et al. 1998).

III.3.2. Mécanisme de production de l'ATP

Le passage des protons à travers la membrane interne établit un gradient électrochimique. L'énergie emmagasinée dans le gradient peut servir à la production d'ATP. La synthèse d'ATP est possible grâce au complexe V appelé ATP synthase. Celui-ci est composé de deux parties, une partie apicale F1 et un segment basal F0 encastré dans la membrane mitochondriale interne.

La pièce apicale F1 contient cinq polypeptides. La portion F0 comprend trois polypeptides. Ceux-ci forment un canal traversant la membrane interne. C'est par ce canal que passent les protons accumulés dans l'espace intermembranaire et se dirigent vers la pièce F1. La formation de l'ATP se base sur l'hypothèse de changement de liaison. En effet, l'ADP et le P_i se lient lâchement au site catalytique en conformation L. Après liaison des protons, il y a une modification de conformation. Cela entraîne une liaison beaucoup plus forte des réactifs ADP/ P_i . Les réactifs se condensent pour produire l'ATP. L'enzyme subit de nouveau un changement de conformation qui permet la libération de l'ATP. Les modifications de conformation s'accompagnent d'une rotation de la pièce F1, ce qui permet d'exposer les sites catalytiques aux protons.

La force protomotrice est aussi utilisée pour le déplacement de l'ADP vers la matrice et de l'ATP vers l'espace intermembranaire et donc du cytosol. Une enzyme ANT (adénine nucléotide translocase) échange de l'ADP contre de l'ATP.

Les molécules d'ATP portent une charge négative de plus que l'ADP. A cause de cette charge négative supplémentaire, les molécules d'ATP passeraient vers l'espace intermembranaire à travers l'ANT selon un potentiel électrique.

III.4.2 Inhibiteurs de complexes de la phosphorylation oxydative

La découverte de la chaîne de transport d'électrons ainsi que l'organisation des différents complexes a été possible grâce à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques (figure I.20.).

III.4.1. La roténone – inhibiteur du complexe I

La roténone est une molécule dérivée de plantes épicées. Elle est notamment utilisée comme insecticide dans les jardins mais elle est aussi capable de tuer des petits poissons présents dans des réservoirs d'eau (Betarbet et al. 2000).

La roténone est une molécule hydrophobe capable de traverser facilement les membranes biologiques. Elle se dirige ensuite vers la chaîne de transport d'électrons où elle inhibe spécifiquement le complexe I.

Triepels et al (Triepels et al. 2001) ont pu mettre en évidence le site d'action de la roténone. En effet, elle se lie à la ND4, une sous-unité de la fraction hydrophobe du complexe I.

III.4.2. Inhibiteurs des autres complexes de la chaîne de transport d'électrons

L'antimycine A et le myxothiazol sont utilisés comme inhibiteurs du complexe III. Cependant, ils agissent à différents niveaux. En effet, l'antimycine A inhibe le passage d'électrons au niveau du cytochrome b. Le myxothiazol empêche quant à lui l'oxydation de l'ubiquinol en ubiquinone.

Le KCN est un inhibiteur du complexe IV (cytochrome c oxydase). Il bloque le passage des électrons entre deux transporteurs du complexe IV.

III.4.3. FCCP agent découplant

Le transfert d'électrons et la synthèse d'ATP sont deux processus intimement liés. Mais il existe des agents découplants comme le FCCP, carbonylcyanide-p-trifluorométhoxyphénylhydrazone. Le FCCP est un protonophore qui provoque la dissipation du gradient électrochimique du proton sans réaliser de synthèse d'ATP (Voet et al. 1998).

III.5 Physiopathologie des mitochondries

L'explication du développement de nombreuses maladies se trouve en partie au niveau des mitochondries. Un dysfonctionnement mitochondrial peut en effet être responsable de l'apparition de certaines maladies comme par exemple la maladie de Parkinson. Cependant, les mécanismes qui mènent à ces altérations au niveau de la mitochondrie sont controversés.

III.5.1. Déclenchement de l'apoptose

Bien que le processus de mort cellulaire soit régulé, les dysfonctionnements ne sont pas rares. En effet, les mitochondries représentent le point de non-retour au delà duquel le processus de mise à mort est irréversible (Kroemer et al. 2000). L'apoptose se marque au niveau des mitochondries par une augmentation de la perméabilité membranaire. Ceci a pour conséquence la perte du potentiel de membrane et l'ouverture des mégapores. Une baisse du taux d'ATP intracellulaire s'ensuit immédiatement. La cellule n'a donc plus assez d'énergie pour assurer sa survie. De plus, on libère de cette manière des molécules pro-apoptotiques comme le cytochrome c et l'apoptosis inducing factor (AIF).

Une autre conséquence de la libération du cytochrome c dans les cellules en apoptose est la génération de radicaux libres due à la réduction incomplète de l'oxygène. Ces radicaux libres en excès vont provoquer des dommages à l'ADN et la peroxydation des lipides membranaires. Tous ces processus vont conduire à la mort de la cellule.

III.5.2. Mutations dans l'ADN mitochondrial

Un dysfonctionnement des mitochondries peut notamment se marquer par la réduction de l'activité du complexe I de la chaîne de transport d'électrons. Cette réduction de l'activité peut être due à une mutation dans les gènes codant pour les protéines du complexe I (Parker 1998). En effet, dans certains cas de maladie de Parkinson, des mutations ont été détectées. Cependant, ils ne représentent qu'une faible proportion de la population atteinte par la maladie de Parkinson.

III.5.3. Facteurs externes

L'altération des mitochondries peut être externe c'est-à-dire que la présence de molécules exogènes peut provoquer une inhibition de l'activité des complexes de la chaîne de transport d'électrons. Ainsi, l'absorption accidentelle de roténone par l'organisme peut induire l'inhibition du complexe I de la chaîne de transport d'électrons et entraîner des symptômes de type Parkinson (Betarbet et al. 2000).

III.6 Conclusions

Les mitochondries jouent un rôle fondamental dans l'homéostasie cellulaire. Des dysfonctionnements au niveau de cet organite sont impliqués dans un grand nombre de maladies, notamment la maladie de Parkinson. En effet, chez ces patients, on observe souvent une diminution de l'activité du complexe I. Cependant, l'étiologie exacte de la maladie de Parkinson reste controversée.

Différents modèles ont été utilisés afin de mieux comprendre le processus de développement de la maladie de Parkinson.

La roténone (inhibiteur spécifique du complexe I) peut être utilisée comme modèle chez des rats pour provoquer l'apparition des symptômes de la maladie de Parkinson (Thiffault et al. 2000). Cependant, Sherer et al ont montré que l'utilisation de la roténone ne reproduisait pas toutes les caractéristiques de la maladie de Parkinson (Sherer et al. 2001). Un autre modèle a donc été utilisé. Le MPP⁺ (1-méthyl-4-phénylpyridinium) est une molécule qui inhibe le complexe I au même site ou à des sites très proches de ceux touchés par la roténone (Cassarino et al. 1999). De plus, cette molécule agit secondairement sur

l'ouverture des mégapores de la membrane mitochondriale et génère des radicaux libres (Sherer et al. 2001). Dans la dernière partie de cette introduction, les actions de cette molécule seront détaillées.

IV. MPP⁺ (1-méthyl-4-phénylpyridinium)

IV.1 □ Origine du MPP⁺

Le MPP⁺ est une toxine qui agit sélectivement sur les neurones dopaminergiques nigrostriataux.

Les premières traces de MPP⁺ ont été décelées au début des années '80. Des dealers de drogue modifiaient leurs produits pour échapper à la liste de produits illicites sans qu'aucun test toxicologique n'ait été effectué (Greenamyre et al. 1999). Finalement, de jeunes drogués utilisant ces produits ont développé les symptômes de la maladie de Parkinson, à savoir des tremblements de repos des membres et des muscles du visage, une rigidité et de la bradykinésie (Siau 2000).

Des études ont permis de découvrir la présence d'une molécule dérivée d'un des composants. Ce produit secondaire a été identifié comme étant le MPTP (1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridium). Cette molécule est un intermédiaire peu toxique mais in vivo, elle est capable de passer la barrière hémato-encéphalique et d'entrer en contact avec la glie. Elle est rapidement oxydée par la monoamine oxydase B en MPDP⁺. Ce dernier est un intermédiaire peu stable qui réagit rapidement via un mécanisme encore inconnu pour donner le MPP⁺ (figure I.21.)

Le MPP⁺ est un substrat des transporteurs dopaminergiques □ il se lie à ces transporteurs et est acheminé au sein des cellules dopaminergiques.

Finalement, il se concentre dans les mitochondries selon un gradient électrochimique (Cassarino et al. 1999). C'est au niveau de la membrane mitochondriale interne qu'il inhibe la NADH-déshydrogénase (complexe I de la chaîne respiratoire de transport d'électrons). En conséquence, les cellules meurent par manque d'énergie.

Cette molécule, MPP⁺, a par la suite été utilisée comme modèle pour induire in vitro et in vivo la maladie de Parkinson (Nakamura et al. 2000).

IV.2 □ Effets du MPP⁺ sur les cellules dopaminergiques

IV.2.1. Action sur le complexe I de la chaîne de transport d'électrons

Le MPP⁺ est connu pour agir principalement au niveau des mitochondries, en particulier en inhibant le complexe I de la chaîne de transport d'électrons. Cette inhibition mène à une diminution du contenu en ATP ainsi qu'à une augmentation de la production de radicaux libres. Mizuno et al ont proposé que le MPP⁺ agit sur le complexe I en raison d'une similarité de structure avec le NAD⁺ (Mizuno et al. 1988).

Des analyses par RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) ont de plus permis de découvrir que le MPP⁺ diminue l'expression de la sous-unité (ND4) du complexe I, un des 13 polypeptides encodés par l'ADN mitochondrial. Cependant, le mécanisme par lequel le MPP⁺ induit cette chute de l'expression de ND4 n'est pas connu. Par ailleurs, on a observé qu'une exposition au H₂O₂ provoque aussi une diminution de l'expression de ND4. Ceci suggère que les radicaux libres générés lors de l'incubation des cellules au MPP⁺ pourraient être impliqués dans le processus d'inhibition de l'activité du complexe I. En parallèle, des études ont montré que l'expression de ND4 était réduite dans le cerveau de patients atteints de la maladie de Parkinson (Conn et al. 2001).

L'inhibition du complexe I par le MPP⁺ aura plusieurs conséquences sur le métabolisme de la cellule.

De fait, cette inhibition va entraîner la mort via une chute de production d'ATP et la formation de radicaux libres (Cassarino et al. 1999). De plus, le MPP⁺ provoque une chute du potentiel de membrane mitochondrial. Cette perte de potentiel est aggravée par une action secondaire du MPP⁺ sur l'ouverture des mégapores traversant les membranes des mitochondries (Nakamura et al. 2000). Suite à l'ouverture des mégapores, certaines molécules sont libérées dans le cytosol de la cellule dont le cytochrome c, l'apoptosis inducing factor, l'endonucléase G et certaines pro-caspases, qui une fois libérées dans le cytosol, vont induire l'apoptose.

Le mécanisme proposé afin d'expliquer l'ouverture des mégapores serait un mécanisme oxydatif qui provoque l'augmentation de la perméabilité membranaire des mitochondries. Cette perméabilité est inhibée par des trappeurs de radicaux libres comme la superoxyde dismutase (SOD) (Cassarino et al. 1999). Cassarino et al proposent que les

radicaux libres stimulent l'ouverture des mégapores en oxydant un site hydrophobe disulfide. Les mégapores sont alors dans une configuration qui favorise la libération des molécules pro-apoptotiques.

Des analyses comparatives ont montré que l'inhibition du complexe I par le MPP⁺ est beaucoup plus faible que celle engendrée par la roténone (inhibiteur spécifique du complexe I). Or, le MPP⁺ est tout aussi capable d'induire la mort cellulaire ce qui signifie que le MPP⁺ agirait à plusieurs autres niveaux (Nakamura et al. 2000). Dans la suite de ce chapitre, nous tenterons d'expliquer l'action du MPP⁺ au niveau cellulaire.

IV.2.2. Action du MPP⁺ sur le métabolisme de la dopamine

La production de radicaux libres en présence de MPP⁺ n'est pas seulement d'origine mitochondriale. Effectivement, Lotharius et al ont également mis en évidence une production de radicaux libres suite à l'oxydation de la dopamine intracellulaire (Lotharius et al. 2000). Le MPP⁺ serait à l'origine de cette oxydation de la dopamine. En effet, le MPP⁺ a une forte affinité pour les transporteurs monoamines vésiculaires (VMAT2) situés en membrane des vésicules de sécrétion. Une partie du MPP⁺ accumulé dans les neurones dopaminergiques est donc stockée dans les vésicules de sécrétion. Une conséquence de la séquestration du MPP⁺ dans les vésicules est la redistribution de la dopamine. En effet, la dopamine est déplacée des vésicules de sécrétion vers le cytosol. Une fois dans le cytosol, la dopamine peut être rapidement auto-oxydée ou déaminée. Il y a donc production de peroxyde d'hydrogène et d'espèces réactives radicalaires toxiques.

De plus, la dopamine peut être relarguée à l'extérieur des cellules et subir une oxydation. Une fois encore, le MPP⁺ serait responsable de ce relargage. Il pourrait maintenir le transporteur dopaminergique dans une configuration telle que la dopamine soit transportée vers l'extérieur de la cellule. Par conséquent, le pool de dopamine intracellulaire chute.

Ces deux phénomènes contribuent à la dégénérescence des neurones dopaminergiques (Lotharius et al. 2000).

IV.2.3. Action du MPP⁺ sur l'ADN mitochondrial

L'intégrité du génome mitochondrial est nécessaire afin d'assurer une fonction mitochondriale normale. Outre des mutations dans le génome mitochondrial responsable du développement de certaines maladies, un dysfonctionnement peut être provoqué suite à une diminution du nombre de copies de l'ADN mitochondrial. Il y a en effet 10^3 à 10^4 copies d'ADN mitochondrial dans une cellule. Le nombre de copies doit être maintenu afin d'assurer l'expression d'une quantité adéquate de protéines encodées par le génome mitochondrial.

Miyako et al ont pu déterminer qu'en présence de MPP⁺, le contenu en ADN mitochondrial diminuait. En présence de MPP⁺, le processus de régulation de l'ADN est donc arrêté. La réplication débute au niveau d'un D-loop. Cette zone est exposée à la machinerie de réplication mais aussi à l'attaque du MPP⁺ et aux stress oxydatifs (Miyako et al. 1997).

Cependant, l'action du MPP⁺ sur l'ADN mitochondrial est indépendante de l'inhibition du complexe I, en ce sens que les radicaux libres générés suite à une inhibition du complexe I par le MPP⁺ ne sont pas responsables de la diminution du nombre de copie de l'ADN mitochondrial. En effet, Miyako et al ont comparé l'effet du MPP⁺ avec celui de la roténone. A l'inverse du MPP⁺, la roténone augmente le contenu en ADN mitochondrial. Suite à l'action de la roténone, le contenu en ADN mitochondrial augmente de façon à contre balancer la diminution des fonctions respiratoires. Ceci signifie aussi que les dommages oxydatifs sur l'ADN mitochondrial en présence de MPP⁺ ont une autre origine. Les radicaux libres pourraient en effet résulter de l'oxydation de la dopamine ou d'une activité plus importante de la synthase d'oxyde nitrique (NOS) suite à une fixation du MPP⁺. Cependant, le mécanisme d'action et de fixation du MPP⁺ sur la NOS est encore inconnu.

Des analyses par Southern blot ont révélé que le MPP⁺ diminue le contenu en ADN mitochondrial sans dégradation du matériel génétique. Ce qui suppose que le MPP⁺ pourrait inhiber le processus même de réplication.

Alors que le MPP⁺ agit sur la réplication, il n'a cependant pas d'effet sur la transcription (Miyako et al. 1999). En effet, le facteur A de la transcription de l'ADN mitochondrial (mtTFA) est un des facteurs assurant la transcription de l'ADN mitochondrial. Des études ont montré que la quantité de mtTFA ne diminue pas. Dès lors, le MPP⁺ n'inhibe pas la transcription de l'ADN mitochondrial mais bien sa réplication.

IV.2.4. Action du MPP⁺ sur l'expression de certaines protéines

En plus d'agir au niveau du complexe I et d'inhiber la réplication de l'ADN mitochondrial, le MPP⁺ peut aussi augmenter l'expression de p53, un facteur de transcription qui contrôle l'expression de différentes protéines telle Bax, une molécule pro-apoptotique. Le mécanisme par lequel le MPP⁺ pourrait augmenter p53 est encore inconnu (Kitamura et al. 1998).

Un second exemple est l'activation par le MPP⁺ d'une kinase appelée JNK (c-jun N-amino-terminal kinase) (Xia et al. 2001). Les JNK sont une famille de kinases activées par des stress cellulaires. Bien que les fonctions des JNK en condition physiologique restent controversées, elles pourraient être des effecteurs de l'apoptose. En effet, JNK pourraient inactiver des facteurs anti-apoptotiques ou activer des facteurs pro-apoptotiques par phosphorylation. L'activation des JNK déclenche la mort programmée au niveau des neurones dopaminergiques dans des modèles in vitro et in vivo. Le mécanisme d'action reste encore peu connu.

IV.3 □ Résumé des actions du MPP⁺

Le MPP⁺ possède donc quatre grands sites d'action. L'inhibition du complexe I provoque une diminution d'ATP et une augmentation de la production de radicaux libres qui pourraient agir sur les mégapores. Le MPP⁺ a un effet sur le métabolisme de la dopamine et provoque son oxydation ainsi que la diminution de son contenu au sein des cellules dopaminergiques. Il agit également en diminuant le contenu en ADN mitochondrial des cellules, ce qui diminue par conséquent la quantité de protéines mitochondriales. Finalement, le MPP⁺ agit sur l'expression de certaines protéines comme p53 ou JNK qui vont induire l'apoptose. Ces différents effets concourent à induire la mort des cellules (figure I.22).

But du mémoire

Comme nous l'avons vu dans cette introduction, au cours du développement de la maladie de Parkinson, les cellules dopaminergiques meurent en grande quantité et ceci par apoptose. L'origine de cette mort par apoptose reste cependant obscure. Il est donc difficile de concevoir un traitement approprié directement ciblé sur la cause de ce processus

Le premier but de ce mémoire est de mettre au point un modèle d'apoptose in vitro qui mimerait la mort des neurones se passant chez les patients atteints de la maladie de Parkinson. Nous avons choisi comme modèle cellulaire, les cellules SH-SY5Y issus d'un neuroblastome humain. Ces cellules possèdent le transporteur dopaminergique. Elles seront intoxiquées par le MPP⁺, qui reste la molécule de référence dans les modèles in vivo qui induisent des symptômes similaires à ceux observés chez les patients atteints de la maladie de Parkinson. La première partie de ce travail a donc été dédiée à cette mise au point. La mise au point d'un modèle expérimental nécessite une étude préliminaire afin de déterminer les conditions expérimentales (paramètres de temps et de concentrations qui occasionnent la mort des cellules). En second lieu, nous avons étudié plus en détails les caractéristiques de l'apoptose pour le modèle choisi. Nous avons ainsi suivi l'activation des caspases, le clivage d'un substrat de la caspase-3 (PARP), la fragmentation de l'ADN ainsi que réalisé une étude de l'évolution du potentiel de membrane mitochondrial. Ces études ont permis de bien caractériser l'apoptose induite par le MPP⁺ chez les cellules SH-SY5Y.

La deuxième partie de ce travail était de tester une molécule potentiellement protectrice et d'en étudier les effets sur le modèle mis au point précédemment.

La molécule MRC2P119 est une molécule de synthèse dérivée du bilobalide. Le bilobalide est un terpène présent dans les feuilles de *Ginkgo biloba*. Il est connu pour ces vertus médicinales dans les maladies vasculaires et les maladies neurodégénératives. Cette molécule est capable d'augmenter la respiration mitochondriale en agissant au niveau du complexe I. En se basant sur des études de structure 3D du bilobalide, une série de nouvelles molécules présentant les mêmes caractéristiques ont été développées. Parmi celles-ci, la molécule MRC2P119 est la plus puissante □ elle a une activité anti-ischémique sur les cellules endothéliales et les neuroblastomes (figure I.23.) (Bouaziz 2001). L'activité de la molécule MRC2P119 se marque par une augmentation de l'activité du complexe I et du taux de respiration mitochondrial ce qui permet une inhibition de la diminution du contenu en ATP des cellules lorsque celle-ci sont exposées à des conditions d'hypoxie.

Comme cette molécule a comme cible pharmacologique le complexe I de la chaîne respiratoire et que c'est ce complexe qui est inhibé par le MPP^+ mais est aussi le plus déficient chez les patients atteints de la maladie de Parkinson, nous avons voulu vérifier si cette molécule pouvait apporter une protection aux cellules intoxiquées par le MPP^+ . L'effet de cette molécule a donc été étudié dans le modèle d'apoptose in vitro mis au point dans la première partie de ce travail.

Matériel et méthodes

I. Culture de cellules SH-SY5Y et Hep G2

I.1: Caractéristiques des cellules utilisées

- SH-SY5Y : lignée cellulaire d'un neuroblastome humain
- Hep G2 : lignée cellulaire provenant d'un hépatome humain

I.2: Matériel et solutions

- milieu de culture DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) auquel on a ajouté 10 % de sérum de veau fœtal et additionné d'antibiotiques
 - Amphotéricine-B : 0,25 µg/ml (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne)
 - Streptomycine sulfate : 100 µg/ml (Sigma, Saint-Louis, USA)
 - Pénicilline : 100 IU/ml (Sigma, Saint-Louis, USA)
- milieu de rinçage (PBS) composé de 154 mM NaCl, 10 mM KH₂PO₄ et de 10 mM K₂HPO₄
- Trypsine-EDTA : solution de trypsine 0,5 g/l et EDTA 0,2 g/l (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne)
- Boîtes de culture T75 (75 cm², Corning, USA)

I.3: Méthode

Lorsque les cellules (SH-SY5Y ou Hep G2) sont arrivées à confluence et forment une monocouche uniforme, elles sont rincées deux fois pendant 30 secondes avec 5 ml de milieu de rinçage. Le milieu de rinçage est ensuite décanté et les cellules sont détachées à l'aide de 2 ml de trypsine-EDTA. L'EDTA chélate les ions Ca⁺⁺ et accélère le détachement des cellules du support.

Une fois que les cellules sont détachées, on ajoute 8 ml de milieu DMEM + 10 % sérum afin d'inhiber l'action de la trypsine.

Les cellules sont alors récoltées au moyen d'une pipette pasteur dans un tube stérile et la suspension cellulaire est centrifugée pendant 4 minutes à 1000 rpm (centrifugeuse Universal, Hettich, Allemagne)

Le surnageant contenant la trypsine et les cellules mortes est décanté et le culot est resuspendu dans du milieu de culture DMEM + 10 % sérum.

Le type de milieu et la quantité requise de cellules est déterminé par l'usage ultérieur des cellules et par le type de boîtes utilisé (T75, T25 ou plaque multipuits).

En général, les cellules SH-SY5Y sont repiquées soit

- dans un rapport de 1 à 2 dans des T75 à raison de 2 fois par semaine pour maintenir la culture cellulaire,

- la veille de l'expérience en plaques à 24 puits à raison de 50 000 cellules/ puits/ml dans du milieu DMEM +10 % sérum.

Les cellules sont finalement incubées dans une atmosphère à 5 % CO₂ et 95 % d'air et à 37°C.

II. Etude de l'apoptose chez les cellules SH-SY5Y et Hep G2

II.1: Principe et caractéristiques de l'apoptose

L'apoptose ou mort programmée de la cellule est caractérisée par une série de changements morphologiques et moléculaires.

La première étape est l'activation de protéases spécifiques appelées caspases (cysteinyl-aspartic-acid-proteases). Un autre paramètre qui s'observe relativement tôt est le flip-flop de la phosphatidyl sérine.

Enfin, la fragmentation de l'ADN en fragments d'environ 180 pb ou multiple de 180 pb s'observe en fin de processus.

Afin de suivre la mortalité cellulaire de manière globale, la libération de la lactate déshydrogénase (LDH) sera mesurée. Ensuite, la mesure de l'activité des caspases et la fragmentation de l'ADN seront utilisées afin de mettre au point les conditions expérimentales

induisant l'apoptose chez les cellules SH-SY5Y et Hep G2. Enfin, le processus d'apoptose sera caractérisé de manière plus fine en suivant le clivage par la caspase-3 d'un de ses substrats, la protéine poly (ADP-ribose) polymérase et l'évolution du potentiel de membrane mitochondrial.

II.2: Molécules utilisées pour induire l'apoptose

Afin d'induire l'apoptose, deux molécules ont été utilisées□

- Le MPP⁺ (Sigma, Saint-Louis, USA) est employé pour induire l'apoptose chez les cellules SH-SY5Y. Le MPP⁺ étant soluble dans l'eau, il sera dilué dans du PBS. Un stock de 1 molaire est préparé puis des dilutions successives de 10 en 10 sont réalisées.
- La roténone (Sigma, Saint-Louis, USA) est utilisée pour induire l'apoptose chez les cellules HepG2. La roténone est une molécule non soluble dans l'eau, elle nécessite l'utilisation d'un solvant organique, le diméthylsulfoxyde (DMSO). Un stock de 100 mM est préparé, ensuite des dilutions successives de 10 en 10 sont réalisées.
- L'antimycine A (Sigma, Saint-Louis, USA) est utilisée pour induire l'apoptose chez les cellules HepG2. Une solution stock de 1 mM d'antimycine A est préparée dans de l'éthanol, ensuite des dilutions successives de 10 en 10 sont réalisées.

Une molécule synthétique sera utilisée au cours de ce travail, la MRC2P119. Cette molécule est testée dans le but de mettre en évidence un effet protecteur contre l'apoptose induite par les molécules décrites ci-dessus. La molécule MRC2P119 est incubée en présence des cellules une heure avant l'incubation de la molécule induisant l'apoptose. Cette molécule étant peu soluble dans l'eau. Un stock de 1 M est préparé dans du PBS/DMSO dans un rapport de 1□5,5, ensuite des dilutions successives de 10 en 10 sont réalisées.

II.3: Mesure de la libération de la lactate déshydrogénase (LDH)

II.3.1. Principe

La LDH est une enzyme cytosolique présente chez tous les types cellulaires. Elle est rapidement libérée dans le surnageant quand la membrane plasmique de la cellule est

endommagée. Sa libération sert donc d'indicateur global de perte de viabilité. L'activité LDH est mesurée selon le principe suivant□ la première étape est la réduction du NAD^+ en $\text{NADH}+\text{H}^+$ par la LDH qui transforme le lactate en pyruvate (figure 11.1.). La seconde étape est le transfert des protons du $\text{NADH}+\text{H}^+$ vers le sel de tétrazolium qui pourra alors être détecté au spectrophotomètre à 490 nm (Ultramark, Biorad).

II.3.2. Matériel et solutions

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) auquel on a ajouté□
 - 10 % de sérum de veau fœtal
 - 10 % Triton X-100 (Sigma, Saint-Louis, USA)
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) sans sérum
- Cytotoxicity Detection Kit (LDH) (Roche, Mannheim, Allemagne)

II.3.3. Méthode

Les cellules sontensemencées la veille de l'expérience en plaques à 24 puits à raison de 50.000 cellules/puits/ml.

Le lendemain, elles sont incubées en présence ou non (cellules contrôles) de différentes concentrations de MPP^+ ou de roténone pendant la durée choisie.

Après ces incubations, le surnageant est récolté et 100 μl de celui-ci sont mis en présence de 100 μl de mixture de réaction. L'ensemble est incubé pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. L'absorbance est ensuite mesurée à 490 nm. (Ultramark, Biorad)

Le tapis cellulaire est ensuite lysé avec 200 μl de DMEM+ 10 % de Triton X-100 pendant 30 minutes à température ambiante. L'activité LDH du lysat cellulaire est alors mesurée selon la même procédure. Le pourcentage de libération de LDH est calculé de la manière suivante□

$$\text{libération de LDH (\%)} = \frac{(\text{LDH surnageant} - \text{blanc})}{(\text{LDH surnageant-blanc}) + (\text{LDH lysat} - \text{blanc})} \times 100$$

II.4: Mesure de l'activité des caspases

II.4.1. Principe

L'induction de l'apoptose chez les cellules nécessite une activation des caspases. On peut mesurer l'activité des caspases grâce à un substrat spécifique de ces protéase qui est une séquence d'acides aminés liée à la rhodamine R 110. Lorsque ces caspases sont activées, elles clivent le substrat synthétique et libèrent ainsi la rhodamine R 110. La quantité de rhodamine R 110 libérée est déterminée par fluorimétrie.

II.4.2. Matériel

- Homogeneous caspases Assay fluorimetric (Roche, Mannheim, Allemagne)

II.4.3. Méthode

Les cellules sontensemencées la veille de l'expérience en plaque 24 puits à raison de 50.000 cellules/puits/ml.

Le lendemain, elles sont incubées en présence ou non (cellules contrôles) de différentes concentrations de MPP⁺ ou de roténone pendant une durée déterminée.

Après les incubations, le milieu de culture est décanté et le tapis cellulaire est lysé en présence de 100 μ l de tampon de lyse dans lequel on a préalablement dilué le substrat des caspases. On incube alors les cellules avec ce substrat pendant 120 minutes à 37°C et à l'abri de la lumière. Après 120 minutes d'incubation, la quantité de rhodamine R 110 libérée est mesurée à l'aide du fluorimètre (BMG LabTechnologies GmbH, Offenburg, Germany) à une longueur d'onde d'excitation de 515 nm et une longueur d'onde d'émission de 555 nm.

II.5: Mise en évidence des caspases actives par immunofluorescence

II.5.1. Principe

L'immunofluorescence utilise des anticorps afin de localiser un antigène intracellulaire. Les anticorps sont conjugués à de petites molécules fluorescentes appelées fluorochromes. La mise en évidence se fait via une observation au microscope confocal.

II.5.2. Matériel

- PBS composé de□tampon PO_4 0,5 M
NaCl 9 g (Merck, Darmstadt□Allemagne)
PH 7,4
- PBS/BSA□2g de BSA (Sigma, Saint-Louis, USA) par 100 ml de PBS
- PBS/ Triton X-100 1 % (Sigma, Saint-Louis, USA)
- Paraformaldéhyde 3 % dans du PBS à 4°C (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- Anticorps primaire (dilué 100 fois dans PBS/BSA) (Promega, Madison, USA)
- Anticorps secondaire couplé au fluorochrome Alexa 88 (dilué 500 fois dans PBS/BSA) (Molecular Probes, USA)
- TO-PRO-3 (dilué 80 fois dans RNase 2 mg/ml de PBS) (Molecular Probes)
- Mowiol (Sigma, Angleterre)
- Lamelles couvre-objet (Vel, Knittel Glaser, Allemagne)
- Lamelles porte-objet (Vel, Knittel Glaser, Allemagne)

II.5.3. Méthode

Les cellules sontensemencées la veille de l'expérience en plaque 24 puits à raison de 50 000 cellules/puits/ml. Un couvre-objet stérile a été placé dans chaque puits. Après le temps d'incubation choisi, le milieu de culture est décanté au maximum. Les cellules sont ensuite fixées avec la paraformaldéhyde 3 % pendant 10 minutes.

- rincer 3 fois au PBS
- perméabiliser les membranes cellulaires avec du PBS+ Triton 1 % pendant 5 minutes

- rincer 3 fois 10 minutes avec PBS/BSA
- déposer 30 μ l d'anticorps primaire dilué sur un parafilm placé en chambre humide
- prendre délicatement la lamelle et la retourner sur la goutte d'anticorps
- laisser réagir l'anticorps pendant 120 minutes à température ambiante
- reprendre les lamelles et les remettre dans la plaque 24 puits
- rincer 3 fois 10 minutes avec PBS/BSA
- déposer 30 μ l d'anticorps secondaire dilué sur parafilm placé en chambre humide.
Cette incubation se fait à l'abri de la lumière pour préserver le fluorochrome.
- incuber avec l'anticorps secondaire pendant 60 minutes en chambre humide
- rincer 3 fois 10 minutes avec du PBS
- déposer 30 μ l de TOPRO-3 dilué sur le parafilm
- incuber les cellules en présence du TOPRO pendant 35 minutes en chambre humide pour un marquage des noyaux
- rincer 3 fois au PBS et monter les lames au Mowiol préchauffé à 56 °C
- laisser polymériser le Mowiol une nuit à 4 °C
- observer au microscope confocal (Leica, Heidelberg, Allemagne)

II.6: Mesure de la fragmentation de l'ADN

II.6.1. Principe

Une autre caractéristique de l'apoptose est l'activation d'une endonucléase qui clive l'ADN en fragment d'environ 180 pb.

L'ADN est enroulé autour de protéines de structure appelée histones. L'ensemble est alors nommé nucléosome. Ces histones représentent un encombrement stérique. De ce fait, la DNase active lors de l'apoptose ne peut cliver qu'entre les nucléosomes. On obtient ainsi des fragments de 180 pb ou des multiples de 180 pb.

Dans le cadre de ce mémoire, la méthode utilisée afin de détecter la fragmentation de l'ADN apparaissant lors de l'apoptose sera la détection des nucléosomes solubles par ELISA.

II.6.2. Méthode

Dosage ELISA (Enzyme-linked-immunosorbent assay)

a) Principe

Ce test est basé sur la quantification de petits fragments d'ADN entourés d'histones via un test ELISA.

Le test ELISA consiste à immobiliser un anticorps primaire («Anti-histone») sur un support solide inerte, tel que le polystyrène. Les extraits cellulaires contenant la protéine à détecter (nucléosomes) est mise en contact avec l'anticorps primaire. Les nucléosomes vont se fixer sur l'anticorps primaire. Ensuite, l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase est mis en présence. Celui-ci reconnaît spécifiquement les fragments d'ADN simple brin ou double brin. La dernière étape consiste à incuber le substrat de la peroxydase, le produit de la réaction sera alors détecté en colorimètre.

b) Méthode

Les cellules sontensemencées la veille de l'expérience en plaque 24 puits à raison de 50.000 cellules/puits/ml.,

Le lendemain, elles sont incubées en présence ou non (cellules contrôles) de différentes concentrations de MPP⁺ ou de roténone pendant la durée choisie. Après les incubations, le surnageant est centrifugé pendant 5 minutes à 2000 rpm et à température ambiante (Heraus Sepatek, Biofuge pico, rotor 3324). Le culot résultant est resuspendu dans 250 µl de tampon de lyse (du Kit Cell Death Detection ELISA, Roche) puis remis sur le tapis cellulaire pendant 30 minutes à température ambiante. Le lysat cellulaire est ensuite récolté et centrifugé pendant 10 minutes à 13000 rpm à 4°C (Heraus Sepatek, Biofuge 17 RS, rotor 1379). Ensuite 150 µl du surnageant est délicatement récupéré pour ne pas toucher le culot qui contient des fragments d'ADN de haut poids moléculaire et est congelé à -20°C en attendant le dosage.

- réaliser le coating de la plaque avec 100 µl d'anticorps primaire («Anti-histone») pendant 60 minutes à température ambiante ou une nuit à 4°C
- réaliser le recoating de la plaque avec 200 µl d'incubation buffer pendant 30 minutes à température ambiante
- rincer 3 x avec 250 µl de liquide de rinçage
- placer 100 µl d'échantillons dilués 100 x dans l'incubation buffer

- incuber pendant 90 minutes à température ambiante
- rincer 3 x avec 250 μ l de liquide de rinçage
- déposer 100 μ l d'anticorps secondaires («Anti-DNA-peroxidase»)
- incuber 90 minutes à température ambiante
- rincer 3 x avec 250 μ l de liquide de rinçage
- dissoudre la pastille substrat dans 5 ml de «Substrate buffer»
- placer 100 μ l/puits de solution contenant le substrat
- placer sur l'agitateur
- lire au spectrophotomètre à 405 nm après 5, 10, 15 et 20 minutes (Ultramark, Biorad)

II.7: Mesure du potentiel de membrane mitochondrial

Lors de l'apoptose, une chute du potentiel de membrane des mitochondries peut être la cause de la libération du cytochrome c selon cette hypothèse, cette étape précéderait donc l'activation des caspases. On peut mesurer le potentiel de membrane mitochondrial grâce à une sonde fluorescente, la tétraméthyl rhodamine éthyl ester (TMRE). Le TMRE se concentre dans les mitochondries selon le potentiel de membrane, la fluorescence émise sera directement proportionnelle à ce potentiel.

II.7.1. Matériel

- HBSS (Hanks's buffer saline solution) composé de
 - NaCl 8 g/l (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - KCl 0,4 g/l (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - Na₂HPO₄ 60 mg/l (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - KH₂PO₄ 60 mg/l (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - MgSO₄-7H₂O 100 mg/l (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - Glucose 1 g/l (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - MgCl₂-6H₂O 100 mg/l (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - pH 7,4
- CaCl₂ 0,2M (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- TMRE à une concentration stock de 10 mM dans du DMSO

- Passive lysis Buffer (Promega, Madison, USA)
- FCCP, carbonylcyanide-p-trifluorométhoxyphénylhydrazone (Sigma, USA) à une concentration de 40 mM

II.7.2. Méthode

Les cellules sontensemencées la veille de l'expérience en plaques à 24 puits à raison de 50.000 cellules/puits/ml.

Le lendemain, elles sont incubées en présence ou non (cellules contrôles) de différentes concentrations de MPP⁺ pendant la durée choisie.

- 35 minutes avant la fin de l'incubation, 10 μ l de FCCP à une concentration de 0,1 μ M sont ajoutés dans les puits correspondant. Le FCCP découple les mitochondries et constitue donc un contrôle positif
- après 5 minutes, ajouter 10 μ l de TMRE/puits afin d'obtenir une concentration finale de 1 μ M
- incuber 30 minutes à 37°C et à 5% CO₂
- rincer 2 fois avec 500 μ l HBSS+ CaCl₂ préchauffé à 37°C
- ajouter 150 μ l de passive lysis Buffer
- agiter 15 minutes à température ambiante
- récupérer le lysat cellulaire de chaque puits dans un eppendorf
- centrifuger 2 minutes à 13.000 rpm (Heraus Sepatek, Biofuge pico, rotor 3324)
- déposer le surnageant dans un puits d'une plaque à 96 puits
- lire la fluorescence à une longueur d'onde d'excitation de 515 nm et à une longueur d'onde d'émission de 612 nm (BMG LabTechnologies GmbH, Offenburg, Germany)

II.8: Western blot

La technique du Western blot permet de localiser une protéine particulière dans un extrait cellulaire. Les principales étapes sont

- séparation des protéines par électrophorèse
- transfert des protéines sur une membrane en diofluorure de polyvylidène
- détection de la protéine par des anticorps spécifiques
- révélation par chimioluminescence.

II.8.1. Préparation des extraits cellulaires totaux

Les extraits cellulaires totaux sont obtenus à partir de cellules SH-SY5Y cultivées dans des boîtes de 25 cm².

a) Matériel et solutions

- tampon de lyse composé de
 - Tris 40 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - KCl 300 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - EDTA 2 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - Triton X-100 1 % (Sigma, Saint-Louis, USA)
 - Inhibiteurs de protéases 1 x (Complete protease inhibitor cocktail tablets 25 x, Roche, Mannheim, Allemagne)
 - Inhibiteurs de phosphatases 1 x à partir d'un stock 25 x
 - NaVO₃ 25 mM (Sigma, Saint-Louis, USA)
 - PNPP (phospho-nitrophényl phosphate) 250 mM
 - β -glycérophosphate 250 mM (Sigma, Saint-Louis, USA)
 - NaF 125 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)

b) Méthode

- lyser les cellules contenues dans des boîtes T25 avec 300 μ l de tampon de lyse
- racler les cellules et récupérer la suspension cellulaire dans un eppendorf
- incuber 30 minutes sur glace
- centrifuger 15 minutes à 15.000 rpm et à 4°C
- récupérer 50 μ l pour le dosage Bradford et environ 170 μ l pour le Western blot
- conserver les échantillons à -20°C

II.8.2. Séparation des protéines par électrophorèse

a) Matériel

- pour 200 ml de gel buffer :
 - 36,3 g de Tris (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - 0,8 g SDS (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - pH 8,9
- gel mix 10 % (le pourcentage est à ajuster en fonction du poids moléculaire des protéines que l'on veut mettre en évidence) :
 - 60 ml de gel buffer
 - 83 ml Acryl/bis (Bio-Rad, Munich, Allemagne)
 - 107 ml d'eau distillée
- gel séparateur :
 - 35 ml du gel mix
 - 175 μ l APS (ammonium persulfate) 25% (Pharmacia Biotech, Sweden)
 - 10,5 μ l de TEMED (Pharmacia Biotech, Sweden)
- spacer gel buffer, pour 100 ml :
 - 5,1 g de Tris (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - 0,4 g SDS (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - pH 6,8
- spacer gel mix :
 - 60 ml spacer gel buffer
 - 40 ml Acryl/bis (Bio-Rad, Munich, Allemagne)
 - 140 ml d'eau distillée
- gel concentrateur :
 - 10 ml de spacer gel mix
 - 50 μ l APS 25 % (Pharmacia Biotech, Sweden)
 - 3 μ l TEMED (Pharmacia Biotech, Sweden)
- tampon Tris 0,5 M pH 6,8
- running buffer 10x, pour 1 litre :
 - 63,2 g Tris (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - 40 g glycine (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - 10 g SDS (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- étalon Full Range Rainbow (Amershamlife science, England), protéines dont la taille est comprise entre 10 et 250 kDa

- cuve à électrophorèse
- un générateur
- bleu de charge 5 x□
 - 10 ml spacer gel buffer
 - 10 ml SDS 20 % (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - 5 ml □-mercaptoéthanol (Fluka, Buchs, Suisse)
 - 10 ml glycérol (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - 17,5 mg bleu de bromophénol (Janssens, Beerse, Belgique)

b) Méthode

Après avoir réaliser le montage des plaques, le gel séparateur est coulé entre les plaques et environ 1 ml d'isobutanol est déposé au dessus. L'isobutanol favorise la polymérisation du gel séparateur en le préservant de l'oxygène et en évitant l'apparition de craquelures en surface du gel. Une fois le gel polymérisé, l'isobutanol est éliminé et on rince abondamment à l'eau distillée. Une couche d'eau en surface est laissée pour la nuit.

Le lendemain, l'eau est éliminée et l'excès d'eau est enlevé avec du papier Whatman. Puis le gel concentrateur est coulé entre les plaques. Un peigne est placé afin de former des puits pour les échantillons. Pendant la polymérisation du gel, les échantillons sont préparés. Grâce au dosage par la méthode Bradford décrite ci-dessous, un volume adéquat d'échantillons est prélevé de manière à obtenir 20 □g de protéines pour chaque échantillon. Ensuite, le tampon d'échantillon est ajouté. On porte à volume (60 □l) avec du tampon Tris 0,5 M pH 6,8. Les échantillons sont bouillis pendant 3 à 4 minutes de manière à dénaturer les protéines.

Après polymérisation du gel concentrateur, le peigne est délicatement retiré et les plaques sont placées dans la cuve à électrophorèse avec du running buffer. Puis les échantillons sont déposés dans le fond du puits. Finalement, on fait migrer 30 minutes à travers le gel concentrateur à 35 mA et pendant 3 heures à travers le gel séparateur à 45 mA.

II.8.3. Transfert

a) Matériel

- membrane de diofluorure de polyvylidène (Bio-Rad, Richmond, USA)
- papier Whatman
- appareil de transfert
- un générateur
- blotting buffer, pour 5 litres
 - 24 g Tris (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - 115 g glycine (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - 1 litre méthanol (JanssenChimica, Beerse, Belgique)

b) Méthode

Premièrement, la membrane est découpée de la même grandeur du gel séparateur. Elle est ensuite réhydratée dans du méthanol 100 % pendant une minute puis équilibrée dans du blotting buffer pendant 5 minutes.

Lorsque le front de migration visualisé par le bleu de bromophénol se trouve à 1 cm du bas du gel, l'électrophorèse est arrêtée.

L'étape suivante consiste en la préparation du système de transfert (système sandwich). Sur le support inférieur de l'appareil de transfert (2117 Multiphor II Electrophoresis Unit, Pharmacia), différentes couches sont déposées selon cet ordre :

- ⇒ une éponge immergée auparavant dans du blotting buffer
- ⇒ 2 feuilles de papier Whatman de la grandeur du gel et imprégnées de blotting buffer
- ⇒ la membrane de PVDF
- ⇒ gel séparateur
- ⇒ 2 feuilles de papier Whatman
- ⇒ une éponge

La membrane est donc posée du côté pôle positif et le gel du côté pôle négatif. Les protéines, chargées négativement (électrophorèse au SDS), vont migrer du gel vers la membrane. Pour terminer la plaque supérieure de l'appareil est placée. Le transfert se fait toute la nuit à 30 mA.

II.8.4. Traitement de la membrane

a) Matériel

- TBS 10x, pour un litre
 - 24,22 g Tris (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - 80,06 g NaCl (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - pH 7,6
- TBS-Tween 0,1 %, pour un litre
 - 100 ml TBS 10x
 - 1 ml de Tween 20 (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - 900 ml eau
- protéines de lait (Gloria)
- anticorps primaires
 - anticorps de souris anti-humain PARP (Pharmingen, Belgique) dilué 200x
- anticorps secondaires
 - anticorps anti-IgG de souris couplé à la peroxydase (Amersham, Gand, Belgique) dilué 2000x
- révélateur SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrat (Pierce, Erembodegem, Belgique)

b) Méthode

Le lendemain, le transfert est arrêté. La membrane est alors placée dans une bouteille en plastique en présence de 20 ml de TBS-Tween + 5 % de gloria pendant une heure à température ambiante, sous agitation. des protéines de lait permettent de saturer la membrane et donc d'empêcher la fixation non spécifique des anticorps. Ensuite, la membrane est mise en présence de l'anticorps primaire pendant 60 minutes minimum.

Après 3 lavages de 5 minutes avec du TBS-Tween + 5 % gloria, une incubation de 45 minutes à température ambiante en présence de l'anticorps secondaire est réalisée.

Avant la révélation, la membrane est rincée 1x pendant 5 minutes avec du TBS-Tween + 5 % gloria et 2x pendant 5 minutes avec du TBS-Tween sans gloria.

La membrane est alors mise en présence du liquide de révélation pendant 90 secondes.

II.8.5. Révélation du film

a) Matériel

- film d'exposition (hyperfilm ECL, Amersham, England)
- révélateur dilué 5x (ILFORD, England)
- fixateur dilué 5x (ILFORD, England)

b) Méthode

La membrane est placée entre deux transparents dans une cassette d'autoradiographie. En chambre noire, un film est déposé dans la cassette. Une exposition d'une minute est souvent suffisante pour obtenir un signal. Cependant, si le signal est trop intense, il convient de diminuer le temps d'exposition, sinon, on augmente le temps d'exposition.

Le film est ensuite immergé dans le révélateur jusqu'à apparition des bandes. Le film est rincé dans l'eau de ville avant de l'incuber dans le fixateur jusqu'à obtenir un film transparent. On rince abondamment à l'eau de ville et on laisse sécher.

Finalement, la taille des bandes est repérée grâce à l'étalon. La membrane peut être conservée à -20°C ou quelques jours à 4°C dans du TBS-Tween.

II.8.6. Contrôle tubuline

a) Principe

L' α -tubuline est une protéine présente dans la plupart des types cellulaires. Un contrôle tubuline permet de vérifier si la même quantité de protéines a été déposée dans les différents puits du gel.

b) Matériels

- anticorps primaire de souris anti- α -tubuline (InnoGenex, San Ramon, USA) dilué 2500x

- anticorps secondaire anti-Ig de souris couplé à la peroxydase (Amersham, Gand, Belgique) dilué 2000x
- TBS-Tween 0,1 %
- Protéines de lait (Gloria)

c) Méthode

On réhybride la membrane avec l'anticorps primaire anti- β -tubuline. La membrane est ensuite placée sous agitation pendant 120 minutes. Après 2 heures, trois lavages de 5 minutes avec du TBS-Tween + 5 % Gloria est réalisé. Ensuite la membrane est mise en présence de l'anticorps secondaire pendant 45 minutes. Un lavage de 5 minutes avec du TBS-Tween + 5 % Gloria et deux lavages de 5 minutes avec du TBS-Tween seul sont effectués. La révélation du film est réalisée comme décrite au point II.7.4.

II.9: Dosage des protéines par la méthode de Bradford

II.9.1 . Matériel

- colorant Bradford (Bio-Rad, Munich, Allemagne)
- étalon albumine (Sigma, Saint-Louis, USA)

II.9.2. Méthode

- diluer le colorant Bradford 5x dans de l'eau distillée
- filtrer la solution
- ajouter 1 ml de colorant pour chaque échantillon
- ajouter de minute en minute 5 μ l de protéines
- laisser agir 5 minutes
- doser au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595 nm
- doser l'étalon (3,6 μ l), un blanc étalon (3,6 μ l d'eau) et un blanc d'échantillon (5 μ l de tampon dans lequel se trouvent les protéines)

La quantité de protéines est calculée de la manière suivante

$\frac{(\text{moyenne échantillon} - \text{moyenne bl}) / (\text{moyenne étalon} - \text{moyenne bl étalon})}{\text{volume de l'échantillon}} \times 5 \text{ (}\mu\text{g/ml)}$
--

Résultats et discussion

I. Mise au point des modèles expérimentaux

La première partie de ce travail a pour but la mise au point d'un modèle cellulaire d'apoptose in vitro induite par une inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale. Pour ce faire, trois inhibiteurs différents de la chaîne respiratoire ont été testés.

I.1. Effet du MPP⁺ sur l'apoptose des cellules SH-SY5Y

Le MPP⁺ a souvent été utilisé comme toxine afin d'induire l'apoptose chez les cellules dopaminergiques. Cependant, les conditions expérimentales décrites dans la littérature qui induisent cette apoptose sont fort variables d'un travail à l'autre. Il nous fallait donc déterminer les paramètres de temps et de concentrations optimaux nécessaires pour induire l'apoptose au sein des cellules SH-SY5Y dans nos conditions expérimentales. Pour ce faire, nous avons choisi de suivre deux paramètres de l'apoptose : l'activation des caspases et la fragmentation de l'ADN. En effet, l'activation des caspases est un événement qui se déroule dans la phase d'initiation de l'apoptose. Les caspases actives permettront ensuite de cliver différents substrats notamment des endonucléases capables de fragmenter l'ADN en fragments d'environ 180 pb ou un multiple de 180 pb. La détection de ces fragments signe donc un événement tardif de l'apoptose.

I.1.1. Description des conditions expérimentales

Les cellules SH-SY5Y sontensemencées la veille de l'expérience en plaque à 24 puits à raison de 50.000 cellules/puits dans du milieu DMEM + 10 % sérum. Le lendemain, elles sont incubées ou non (cellules contrôles) en présence de différentes concentrations en MPP⁺ pendant 8, 24 ou 48 heures. Pendant toute la durée de l'expérience, les cellules sont dans du milieu DMEM + 10 % sérum.

A la suite de ces incubations, l'activité des caspases et la fragmentation de l'ADN sont mesurées.

I.1.2. Résultats et discussion

A) Mesure de l'activité des caspases

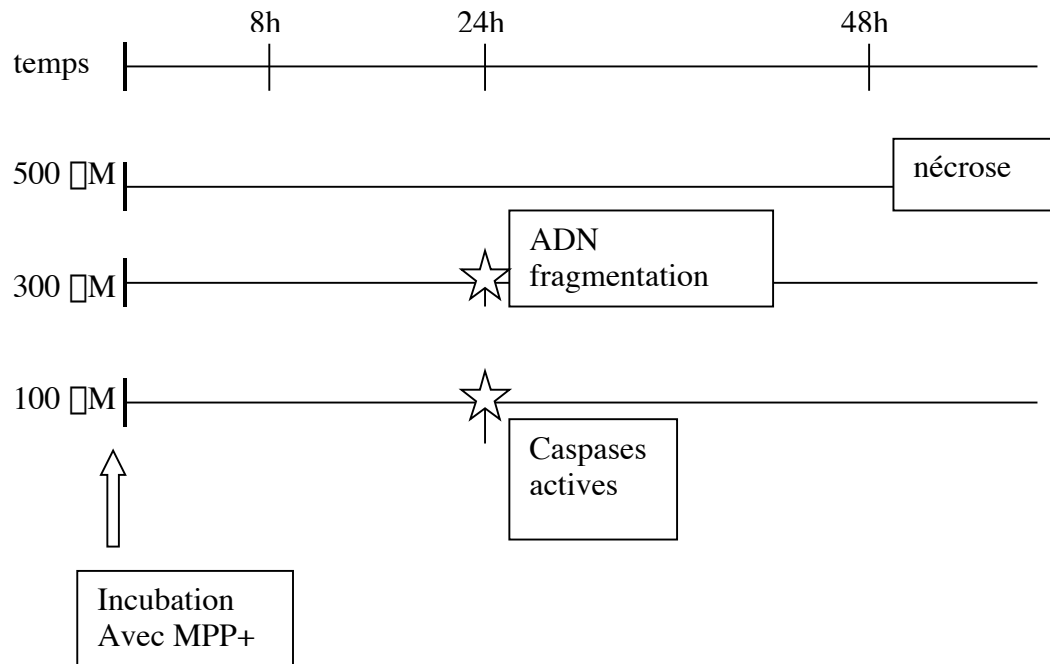
La figure III.1 présente l'effet du MPP⁺ sur l'activité des caspases. Nous observons qu'après une incubation de 8 heures, aucune augmentation de cette activité n'est détectée quelle que soit la concentration en MPP⁺. De même, après 24 heures d'incubation, nous n'observons aucune augmentation de l'activité des caspases et ce, même aux concentrations élevées en MPP⁺. Par contre, une augmentation de 25 % et 13 % est respectivement observée à 50 et 100 μ M en MPP⁺.

Après une incubation de 48 heures en présence de MPP⁺, on observe une légère activation des caspases à 50 μ M et 100 μ M. Cependant, nous constatons que l'activité des caspases des cellules incubées en présence de fortes concentrations en MPP⁺ (500 μ M et 300 μ M) n'est pas augmentée par rapport à celle des cellules contrôles. Il est probable qu'après 48 heures d'incubation avec 500 μ M et 300 μ M, le signal des caspases actives soit éteint. En effet, une fois que les caspases ont clivé leurs substrats, elles sont détruites par le protéasome. Une autre possibilité serait que ces concentrations soient trop toxiques et induisent la mort des cellules par nécrose plutôt que par apoptose. En effet, une observation au microscope à contraste de phase des cellules SH-SY5Y après une incubation de 48 heures montre que toutes les cellules sont mortes à 500 μ M en MPP⁺.

B) Mesure de la fragmentation de l'ADN

La figure III.2 présente l'effet du MPP⁺ sur la fragmentation de l'ADN des cellules SH-SY5Y. Nous observons une augmentation de la fragmentation de l'ADN aux concentrations de 250 μ M et 300 μ M par rapport aux cellules contrôles, respectivement de l'ordre de 44 % et de 67 %. Par contre, aucune augmentation par rapport au contrôle n'est détectée à 500 μ M, ce qui renforce l'hypothèse que cette concentration pourrait être trop toxique et n'induire que de la nécrose.

En considérant les résultats des figures III.1 et III.2 et en sachant que l'activation des caspases précède la fragmentation de l'ADN, nous pouvons proposer le schéma suivant□



Si l'activation des caspases chez les cellules SH-SY5Y s'observe à 24 heures et à 48 heures d'incubation en présence de 100 μ M de MPP⁺, nous pouvons supposer que la fragmentation de l'ADN se déroulera plus tard au cours de l'incubation. De même si l'ADN fragmenté est détecté à 24 heures d'incubation avec 300 μ M de MPP⁺, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'activation des caspases se produit avant cet événement. Nous ne l'avons cependant pas observée à 8 heures. Il aurait fallu tester des temps plus courts et plus longs pour détecter la fenêtre de temps pendant laquelle les caspases sont activées dans ces conditions. Finalement, alors que toutes les cellules paraissaient mortes, l'absence d'ADN fragmenté après 48 heures d'incubation en présence de 500 μ M laisse supposer que cette concentration est trop toxique pour les cellules qui meurent alors par nécrose dans ces conditions. Ces quelques expériences indiquent que, dans certaines conditions, les cellules incubées en présence de MPP⁺ peuvent mourir par apoptose mais les conditions que nous avons testées jusqu'à présent ne semblent pas encore optimales.

I.2. Effet de la roténone sur l'apoptose des cellules HepG2

Comme le MPP⁺ inhibe le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale et peut induire de l'apoptose chez les cellules SH-SY5Y, nous avons voulu vérifier si un autre inhibiteur du complexe I, à savoir la roténone, pouvait avoir le même effet. Puisque la roténone est capable de traverser la membrane plasmique, elle peut donc affecter tous les types cellulaires. Nous avons choisi d'étudier son effet sur les cellules HepG2 (hépatome humain). En effet, il a été montré précédemment au laboratoire que celles-ci pouvaient mourir par apoptose dans différentes situations (Piret et al. 2002).

Comme la roténone est un inhibiteur très puissant du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, les concentrations utilisées seront plus basses que celles utilisées pour le MPP⁺, de l'ordre de 1 à 10⁻³ μ M.

De nouveau, nous avons d'abord tenté de mettre au point les paramètres de temps et de concentrations qui induiraient une apoptose importante des cellules HepG2. Les mesures de l'activité des caspases et de la fragmentation de l'ADN ont été effectuées comme précédemment.

I.2.1. Description des conditions expérimentales

Les cellules HepG2 sontensemencées la veille de l'expérience en plaque à 24 puits à raison de 50.000 cellules/puits dans du milieu DMEM + 10 % sérum. Le lendemain, elles sont incubées ou non (cellules contrôles) avec différentes concentrations en roténone pendant 4, 6 ou 18 heures. Pendant toute la durée de l'expérience, les cellules sont dans du milieu DMEM + 10 % sérum.

Une mesure de l'activité des caspases et de la fragmentation de l'ADN sont réalisées à la fin de ces incubations.

I.2.2. Résultats et discussion

A) Mesure de l'activité des caspases

La figure III.3 présente l'effet de la roténone à différents temps d'incubation et à différentes concentrations sur l'activité des caspases des cellules HepG2.

Seules les concentrations de 0,01 μ M et 0,001 μ M en roténone induisent une augmentation de l'activation des caspases qui est détectable après 18 heures d'incubation. On n'observe pas d'augmentation aux concentrations plus fortes, telles que 0,1 μ M et 0,05 μ M en roténone. On peut expliquer ce résultat en suggérant qu'au delà de 0,01 μ M en roténone, l'activation des caspases se produit avant les 4 heures d'incubation ou qu'elle n'aurait pas lieu car les cellules meurent par nécrose. En effet, observées au microscope à contraste de phase, la plupart des cellules apparaissent mortes après une incubation de 18 heures en présence de 0,1 μ M en roténone.

Afin de confirmer ces résultats, nous avons suivi l'évolution de la fragmentation de l'ADN dans ces mêmes conditions.

B) Mesure de la fragmentation de l'ADN

La figure III.4 montre les résultats obtenus lorsque les cellules sont incubées pendant 24 heures en présence de roténone. Aucune augmentation de la fragmentation de l'ADN n'est observée quelle que soit la concentration en roténone testée. Il faut cependant remarquer que la fragmentation de l'ADN est plus importante chez les cellules contrôles que chez les cellules incubées en présence de concentrations croissantes en roténone. Ce résultat est inexpliqué.

I.3. Effet de l'antimycine sur l'apoptose des cellules HepG2

Le MPP⁺ et la roténone sont tout deux des inhibiteurs du complexe I de la chaîne de transport d'électrons. D'après nos résultats, le MPP⁺ pourrait conduire à l'induction de l'apoptose chez les cellules SH-SY5Y. Nous avons tenté par la suite de savoir si une inhibition spécifique du complexe III de la chaîne de transport d'électrons pouvait également initier le processus apoptotique. Pour ce faire, l'antimycine a été utilisée comme inhibiteur spécifique du complexe III pour induire l'apoptose chez les cellules HepG2.

I.3.1. Description des conditions expérimentales

Les cellules HepG2 sontensemencées la veille de l'expérience en plaque à 24 puits à raison de 50.000 cellules/puits dans du milieu DMEM + 10 % sérum. Le lendemain, elles sont incubées ou non (cellules contrôles) en présence de différentes concentrations en antimycine

pendant 4, 8 ou 18 heures. Pendant toute la durée de l'expérience, les cellules sont maintenues dans du milieu DMEM + 10 % sérum.

Au terme de ces incubations, les mesures de l'activité des caspases et de la fragmentation de l'ADN sont effectuées.

I.3.2. Résultats et discussion

A) Mesure de l'activité des caspases

La figure III.5 présente l'effet de l'antimycine à des temps d'incubation et des concentrations croissantes sur l'activité des caspases des cellules HepG2. Aucune activité des caspases n'est détectée quelle que soit les conditions de temps ou de concentrations testées, si ce n'est une activité quasi doublée des caspases en présence de 0,25 μ M d'antimycine après 8 heures d'incubation ainsi qu'une augmentation de celle-ci en présence de 0,1 μ M d'antimycine après 4 et 8 heures d'incubation. Pour confirmer ces résultats, nous avons mesuré la fragmentation de l'ADN des cellules HepG2 incubées en présence d'antimycine.

B) Mesure de la fragmentation de l'ADN

La figure III.6 présente l'effet de l'antimycine sur la fragmentation de l'ADN après une incubation de 18 heures. Aucune augmentation de la fragmentation de l'ADN n'est observée par rapport aux cellules contrôles.

L'antimycine ne semble donc pas capable d'induire l'apoptose des cellules HepG2 dans ces conditions-là. Deux hypothèses pourraient être envisagées pour expliquer cette observation. D'une part, nous n'avons peut-être pas couvert toutes la gamme de temps et de concentrations possibles. D'autre part, il faut se rappeler que l'antimycine est un inhibiteur spécifique du complexe III. Le mécanisme impliqué dans l'initiation de la mort cellulaire induite par cette inhibition pourrait être différent de celui initié par une inhibition du complexe I. On sait par exemple que l'antimycine augmente la production de dérivés actifs de l'oxygène alors que la roténone la diminue (Chandel et al. 2000).

I.4. Conclusion

Les conditions expérimentales que nous avons testées jusqu'à présent ne semblent pas induire une forte augmentation de l'activité des caspases et de la fragmentation de l'ADN. Quelle que soit la molécule testée, nous n'avons donc pas de «Bon» modèle d'apoptose dans ces conditions. La présence de sérum pendant l'incubation pourrait retarder ou diminuer la réponse de mort cellulaire. C'est pourquoi, dans la suite du travail, les conditions expérimentales ont été modifiées dans le but d'obtenir un signal apoptotique plus important. Les cellules seront donc incubées en présence de l'inhibiteur mais en absence de sérum. Pour cela, une heure avant l'incubation en présence de l'inhibiteur, les cellules seront privées de sérum. Nous avons choisi de nous focaliser sur l'effet du MPP⁺ sur les cellules SH-SY5Y d'une part pour que cela reste le modèle de choix pour induire les effets similaires observés dans la maladie de Parkinson et d'autre part parce que les résultats précédents montrent que c'est dans ces conditions que l'apoptose peut être détectée. Finalement, les concentrations en MPP⁺ testées seront plus fortes (de 0,5 mM à 5 mM) car ce sont ces concentrations en MPP⁺ que King et al (King et al. 2001) ont utilisées pour induire l'apoptose des cellules SH-SY5Y.

II. Caractérisation des paramètres de l'apoptose

II.1. Effet du MPP⁺ sur les cellules SH-SY5Y

II.1.1. Description des conditions expérimentales

Les cellules SH-SY5Y sontensemencées la veille de l'expérience en plaque à 24 puits à raison de 50.000 cellules/puits dans du milieu DMEM + 10 % sérum. Le lendemain, une heure avant l'incubation avec le MPP⁺, le milieu est décanté ou non (cellules contrôles avec sérum, CTL S) et remplacé par du milieu DMEM sans sérum, puis, elles sont incubées ou non (cellules contrôles, CTL SS) en présence de différentes concentrations en MPP⁺ pendant une durée déterminée.

A la suite de ces incubations, la libération de la lactate déshydrogénase (LDH), l'activité des caspases et la fragmentation de l'ADN sont mesurées.

II.1.2. Résultats et discussion

A) Expérience préliminaire□ mesure de la libération de la LDH

Afin de déterminer si les fortes concentrations en MPP⁺ choisies pouvaient induire une forte mortalité des cellules SH-SY5Y lorsque celles-ci sont en plus privées de sérum, nous avons mesuré la libération de LDH. Cette mesure donne une mesure de la mortalité cellulaire quelque soit le mécanisme sous-jacent. En effet, lorsqu'une molécule est toxique pour les cellules, on observe une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique avec libération dans le milieu de culture des constituants cytoplasmiques, un de ces constituants facilement détectables est la lactate déshydrogénase (LDH). Plus il y a de LDH libéré par les cellules, plus il y a de mortalité.

La figure III.7 présente l'effet de concentrations croissantes en MPP⁺ sur la libération de LDH par les cellules SH-SY5Y. Nous observons une forte mortalité des cellules SH-SY5Y, mortalité qui augmente en fonction de la concentration en MPP⁺. Elle est de l'ordre de 93 % en présence de 5 mM en MPP⁺.

Comme une mortalité cellulaire est observée après 18 heures en présence de 2,5 mM et 5 mM en MPP⁺, nous avons vérifié si cette mort cellulaire était due à de l'apoptose en suivant différents paramètres caractéristiques de l'apoptose. Ainsi, nous avons d'abord étudié l'activation des caspases en mesurant leur activité, la présence de la caspase-3 activée dans les cellules par immunofluorescence et le clivage d'un de leurs substrats, la protéine PARP. Ensuite, nous avons suivi la fragmentation de l'ADN, qui est un des paramètres tardifs de l'apoptose. Enfin, comme nous l'avons décrit dans l'introduction (point II.5.2.1), la perte du potentiel de membrane mitochondrial est souvent associée à l'initiation de l'apoptose. Comme nous utilisons une molécule qui inhibe le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, nous avons voulu vérifier si une diminution du potentiel de membrane mitochondrial était provoquée dans les cellules incubées en présence de MPP⁺. Les résultats des expériences sont décrits ci-dessous.

B) Mesure de l'activité des caspases

La figure III.8 illustre les résultats obtenus pour la mesure de l'activité des caspases après 4, 18 et 24 heures d'incubation. Nous observons, dans les trois conditions, une augmentation importante de l'activité des caspases en présence de 5 mM et 2,5 mM de MPP⁺ et ce, aux trois temps d'incubation. On observe également une augmentation de l'activité des caspases après 16 heures d'incubation en présence de 1,25 mM de MPP⁺. Il est intéressant de noter que, bien qu'une concentration de 5 mM induise une forte mortalité cellulaire par rapport à 2,5 mM lorsque la libération de LDH est suivie, cette concentration n'engendre pas une activation des caspases plus forte que celle observée à 2,5 mM. Ceci suggère que les cellules meurent dans ce cas majoritairement par nécrose.

C) Mise en évidence des caspases actives par immunofluorescence

Les mesures d'activité des caspases réalisées jusqu'à présent sont des dosages quantitatifs permettant de savoir si les caspases sont activées globalement dans les différentes conditions expérimentales, mais ne donnent pas d'idée sur la proportion de cellules touchées. L'immunofluorescence révélant la caspase-3 active permet de savoir si les caspases sont activées dans l'ensemble de la population cellulaire ou si seulement quelques cellules présentent le phénotype apoptotique. Pour réaliser ce marquage, nous avons utilisé comme

anticorps primaire un "anti-caspase-3 active". Celui-ci est alors détecté de manière indirecte par un anticorps secondaire couplé au fluorochrome Alexa. On observe ensuite les cellules au microscope confocal.

Les photos présentées à la figure III.9 illustrent l'effet du MPP⁺ sur l'activation de la caspase-3 après 3 heures d'incubation en présence de MPP⁺. En absence de MPP⁺, on note un faible marquage de la caspase-3 active qui est légèrement plus marqué dans les cellules privées de sérum par rapport aux cellules cultivées en présence de sérum tout au long des incubations. L'absence de sérum représente probablement un stress supplémentaire pour les cellules SH-SY5Y. On remarque, par ailleurs, que le MPP⁺ est capable d'activer la caspase-3 et que cette activation concerne l'ensemble de la population cellulaire. Cependant, cette technique ne permet pas de quantifier ni de déterminer quelle est la concentration qui a l'effet le plus important sur les cellules SH-SY5Y. Cette observation confirme que le MPP⁺ à 1 et 2,5 mM est capable d'induire l'apoptose des cellules SH-SY5Y lorsque l'incubation se passe en absence de sérum.

D) Clivage d'un substrat de la caspase-3 : la poly (ADP-ribose) polymérase (PARP)

Les caspases sont des protéases qui clivent différents substrats. Par exemple, la caspase-3 est capable de cliver une enzyme de réparation de l'ADN, la poly (ADP-ribose) polymérase (PARP). Cette protéine a un poids moléculaire de 116 kDa. Lorsque la caspase-3 est activée, PARP est clivée en un fragment de 85 kDa qui peut être détecté par Western blot. Nous avons donc voulu vérifier que le MPP⁺, puisqu'il est capable d'activer les caspases, induisait ce clivage. Pour ce faire, les cellules SH-SY5Y sontensemencées la veille de l'expérience dans des boîtes T25 à raison de 665.000 cellules/T25 dans du milieu DMEM + 10 % sérum. Le lendemain, une heure avant l'incubation du MPP⁺, le milieu est décanté ou non (cellules contrôles avec sérum, CTL S) et remplacé par du milieu DMEM sans sérum. Puis, les cellules sont incubées ou non (cellules contrôles, CTL SS) pendant 16 heures en présence de concentrations croissantes en MPP⁺. Les cellules sont ensuite lysées et les extraits de protéines sont analysés par Western blot en utilisant un anticorps anti-PARP. La mise en évidence de la protéine d'intérêt se fait de manière indirecte par l'emploi d'anticorps anti-Ig G couplé à la peroxydase dont l'activité est révélée par chémoluminescence.

Les résultats présentés à la figure III.10 illustrent l'effet du MPP^+ sur le clivage de PARP. Nous observons un effet dépendant de la concentration : plus la concentration en MPP^+ augmente, plus la quantité de PARP clivée en un fragment de 85 kDa augmente. L'effet est plus marqué à une concentration de 2,5 mM en MPP^+ . Nous pouvons aussi noter que l'absence de sérum induit l'apoptose d'une petite partie de la population de cellules puisque nous observons une petite quantité de fragment de 85 kDa.

Afin de vérifier si la même quantité de protéines a été déposée dans les puits, on détecte la présence de l' α -tubuline. L'intensité de chaque bande montre qu'une même quantité de protéines a bien été chargée dans chaque puits.

E) Mesure de la fragmentation de l'ADN

Les résultats précédents suggèrent que le MPP^+ en absence de sérum est capable d'induire l'apoptose des cellules SH-SY5Y puisqu'on observe une activation des caspases et le clivage d'un de leurs substrats (PARP). Une des caractéristiques des cellules apoptotiques en phase terminale est la fragmentation de l'ADN. Nous avons donc vérifié si le MPP^+ dans ces conditions induisait cette fragmentation.

La figure III.11 présente l'effet du MPP^+ sur la fragmentation de l'ADN à différents temps d'incubation (12, 16 et 24 heures). On observe qu'aux faibles concentrations (1 mM et 0,5 mM), aucune augmentation de la fragmentation d'ADN n'est observée. L'apoptose n'est donc pas déclenchée en présence de faibles concentrations en MPP^+ . D'autre part, une concentration de 2,5 mM en MPP^+ provoque une fragmentation de l'ADN qui augmente au cours du temps. En effet, après 12 heures d'incubation et à 2,5 mM en MPP^+ , nous observons une augmentation de 29 % de la fragmentation de l'ADN par rapport aux cellules contrôles (CTL SS), alors qu'elle est de 102 % après 16 heures et de 135 % après 24 heures d'incubation.

D'autre part, aucune augmentation de la fragmentation de l'ADN n'est observée quelque soit le temps d'incubation lorsque les cellules sont incubées en présence de MPP^+ à 5 mM. Il est intéressant de noter que ces résultats sont bien corrélés avec ceux obtenus pour la mesure de l'activité des caspases.

F) Mesure du potentiel de membrane mitochondrial

Nous avons signalé dans l'introduction qu'un des phénomènes qui peut se passer pendant de l'apoptose est l'augmentation de la perméabilité membranaire des mitochondries qui se marque alors par une chute du potentiel de membrane. Cependant, selon les modèles expérimentaux, cette chute du potentiel peut être précoce et être impliquée dans l'initiation de l'apoptose (Patel et al. 1998) ou être tardive et n'être qu'une conséquence de la mort des cellules (Krohn et al. 1999). Afin de vérifier si cet événement est impliqué dans l'induction de l'apoptose dans notre modèle expérimental, nous avons mesuré le potentiel de membrane mitochondrial avant et après l'activation des caspases. Si, la chute du potentiel de membrane mitochondrial est effectivement responsable de l'activation des caspases via la libération du cytochrome c, alors cette chute du potentiel de membrane doit donc être détectée avant l'activation des caspases.

La figure III.8 montre que les caspases sont déjà actives chez les cellules SH-SY5Y après 4 heures d'incubation en présence de 2,5 mM de MPP⁺. C'est pourquoi nous avons choisi de mesurer le potentiel de membrane mitochondrial après 3 heures (avant cette activation) et après 8 heures (après cette activation) d'incubation. Les résultats sont présentés à la figure III.12. Aucune chute du potentiel de membrane mitochondrial n'est visible en présence du MPP⁺ après 3 heures d'incubation. Par contre, l'ajout de FCCP à 0,1 μ M pendant les 35 dernières minutes de l'incubation diminue fortement le potentiel de membrane. Le FCCP est un agent découplant qui dissipe le gradient de protons établi de part et d'autre de la membrane mitochondrial interne. Le FCCP nous a servi de contrôle positif de la chute du potentiel de membrane mitochondrial. En effet, lorsqu'il est ajouté aux cellules, nous observons une chute de la fluorescence mesurée ce qui montre que la méthode que nous avons utilisée est bien capable de détecter des variations du potentiel de membrane mitochondrial. Après une incubation de 8 heures, une chute du potentiel de membrane par rapport aux cellules contrôles est observée. Cette diminution est d'autant plus marquée que la concentration en MPP⁺ augmente.

Il est à noter que l'absence de sérum provoque à elle seule une faible diminution du potentiel de membrane mitochondrial après 8 heures d'incubation.

Ces résultats suggèrent que la chute du potentiel de membrane n'est pas la cause de la libération du cytochrome c et donc de l'activation des caspases puisqu'elle est très tardive. Elle serait donc la conséquence et non la cause de la mort cellulaire. En effet, Green et al (Green et al. 1998) proposent que les caspases ou leurs substrats pourraient agir sur les mégapores ou les complexes Bcl-2/Bax et ainsi perturber l'intégrité de la membrane

mitochondriale et provoquer une augmentation de la perméabilité de la membrane mitochondrial interne. Ce mécanisme pourrait alors amplifier la libération du cytochrome c et donc l'activation des caspases et la mort par apoptose.

G) Conclusion

Les résultats décrits ci-dessus indiquent que le MPP⁺ est capable d'induire l'apoptose des cellules SH-SY5Y lorsque celles-ci sont incubées en présence de MPP⁺ dans un milieu sans sérum. En effet, nous avons été capables de détecter différentes caractéristiques de l'apoptose, comme l'activation des caspases, le clivage de PARP par la caspase-3, la fragmentation de l'ADN en fragments d'environ 180 pb, et la chute du potentiel de membrane mitochondrial. L'effet optimal est obtenu avec une concentration de 2,5 mM de MPP⁺. Ce sont ces conditions expérimentales qui seront utilisées dans la troisième partie de ce mémoire, afin d'étudier l'effet protecteur éventuel de la molécule MRC2P119.

II.2. Effet de la roténone sur les cellules HepG2

En parallèle à l'étude de l'effet du MPP⁺ sur les cellules SH-SY5Y, nous avons poursuivi l'étude de l'effet de la roténone sur les HepG2. Il nous semblait en effet important de déterminer si un autre inhibiteur du complexe I pouvait aussi induire l'apoptose ou si cet effet était propre au MPP⁺.

II.2.1. Description des conditions expérimentales

Les cellules HepG2 sontensemencées la veille de l'expérience en plaque à 24 puits à raison de 50.000 cellules/puits dans du milieu DMEM + 10 % sérum. Le lendemain, une heure avant l'incubation en présence de roténone, le milieu est décanté ou non (cellules contrôles avec sérum) et remplacé par du milieu DMEM sans sérum, puis, les cellules sont incubées ou non (cellules contrôles) en présence de différentes concentrations en roténone pendant une durée déterminée.

Au terme de ces incubations, la libération de la lactate déshydrogénase (LDH), l'activité des caspases et la fragmentation de l'ADN sont mesurées.

II.2.2. Résultats et discussion

A) Expérience préliminaire – mesure de la libération de la lactate déshydrogénase

Afin de déterminer si la roténone pouvait induire la mort des cellules HepG2, ces cellules ont été incubées en présence de concentrations croissantes en roténone pendant 16 heures et la libération de la lactate déshydrogénase (LDH) a été suivie.

La figure III.13 présente les résultats de cette expérience. Nous observons une augmentation de la libération de la LDH qui est dépendante de la concentration jusqu'à 1 μ M. L'effet moindre obtenu à 5 μ M est difficilement explicable.

B) Mesure des paramètres de l'apoptose

Les figures III.14 et III.15 illustrent respectivement les résultats obtenus pour la mesure de l'activité des caspases après 4 heures d'incubation et de la fragmentation de l'ADN après 16 heures d'incubation. Nous observons une augmentation de l'activité des caspases dépendante de la concentration jusqu'à 0,5 μ M en roténone. Aucune augmentation n'est détectée aux concentrations plus élevées. L'effet optimal est donc obtenu avec une concentration de 0,5 μ M en roténone. Ces résultats sont confirmés lorsque la fragmentation de l'ADN induite par la roténone est mesurée. De nouveau, l'effet optimal est observé avec une concentration de 0,5 μ M en roténone. L'étude d'une gamme plus large de temps et de concentrations en roténone nous aurait peut-être permis de mieux comprendre l'effet potentiel pro-apoptotique de la roténone sur les cellules HepG2. Cependant, et même si les conditions expérimentales ne sont pas encore optimales, les résultats obtenus permettent de supposer que la roténone est capable d'induire l'apoptose chez les cellules HepG2 tout comme le MPP⁺ chez les cellules SHSY5Y.

III. Effet de la molécule MRC2P119 sur l'apoptose induite par le MPP⁺

La molécule MRC2P119 est une molécule synthétique dérivée du bilobalide. Elle augmente l'activité respiratoire des mitochondries et a une action anti-ischémique. Elle exerce ces effets parce qu'elle est capable d'augmenter l'activité du complexe I. Etant donné que cette molécule a comme cible pharmacologique le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale et puisque le MPP⁺ est un inhibiteur de ce complexe, il nous a semblé intéressant d'étudier si la molécule MRC2P119 pourrait protéger les cellules SH-SY5Y de la toxicité induite par le MPP⁺ et en particulier de l'induction de l'apoptose. Suite aux résultats des expériences précédentes, nous avons choisi une concentration de 2,5 mM en MPP⁺ pour réaliser ces expériences.

III.1. Description des conditions expérimentales

Les cellules SH-SY5Y sontensemencées la veille de l'expérience en plaque à 24 puits à raison de 50.000 cellules/puits dans du milieu DMEM + 10 % sérum. Le lendemain, une heure avant l'incubation en présence de MPP⁺, le milieu de culture est décanté ou non (cellules contrôles avec sérum) et remplacé par du milieu DMEM sans sérum contenant ou non la molécule MRC2P119 à différentes concentrations. Ensuite, les cellules sont incubées ou non (cellules contrôles) en présence de MPP⁺ à 2,5 mM pendant une durée déterminée.

A la suite de ces incubations, l'activité des caspases, le clivage de PARP, la fragmentation de l'ADN et le potentiel de membrane mitochondrial sont mesurés.

III.2. Résultats et discussion

A) Etude morphologique

L'effet toxique du MPP⁺ est nettement observable en microscope à contraste de phase. Nous avons donc voulu, dans une première approche, visualiser une éventuelle protection apportée par la molécule MRC2P119 par simple observation des cellules. Des photos

représentatives de la morphologie des cellules incubées en présence ou en absence de MPP^+ pendant 16 heures avec ou sans molécule MRC2P119 sont présentées à la figure III.16. On observe que le MPP^+ engendre la mort de la plupart des cellules. Par contre, en présence de molécule MRC2P119 à 10^{-3} M, on observe une protection complète des cellules□ leur morphologie et leur densité ne semblent pas différer de celles des cellules contrôles. Cette protection est moins prononcée à 10^{-4} M.

B) Mesure de l'activité des caspases

La figure III.17 présente l'effet de la molécule MRC2P119 sur l'activation des caspases induite par le MPP^+ après une incubation de 4 heures. On observe qu'en présence de MPP^+ seul, l'activité des caspases augmente de 60 % par rapport aux cellules contrôles sans sérum. Si ces cellules sont préincubées pendant 1 heure en présence de la molécule MRC2P119 avant l'ajout du MPP^+ , on observe que celle-ci est capable d'inhiber totalement l'activation des caspases. Cet effet de protection diminue si la concentration en molécule MRC2P119 diminue.

C) Mise en évidence des caspases actives par immunofluorescence

Afin de vérifier si la protection apportée par la molécule MRC2P119 concernant l'activation des caspases induites par le MPP^+ concerne l'entièreté de la population cellulaire, un marquage des cellules grâce à l'anticorps "anti-caspases-3 active" a été réalisé.

Les photos présentées à la figure III.18 illustrent l'effet de la molécule MRC2P119 sur l'activation de la caspase-3 induite par le MPP^+ . Le MPP^+ induit une augmentation de la quantité de caspase-3 active dans la plupart des cellules par rapport aux cellules contrôles. Nous observons une diminution nette de ce marquage lorsque les cellules sont préincubées en présence de la molécule MRC2P119 avant l'ajout du MPP^+ et ce, quelle que soit la concentration en molécule. Ces résultats indiquent à nouveau que la molécule MRC2P119 est capable d'inhiber l'activation des caspases induite par le MPP^+ chez les cellules SH-SY5Y.

D) Détection par Western blot d'un substrat de la caspase-3 PARP

La figure III.10 indiquait que le MPP^+ , en activant les caspases, induisait le clivage d'un des substrats de ces protéases, la protéine PARP. Comme la molécule MRC2P119 à 10^{-3} M est capable d'inhiber l'activation des caspases induite par le MPP^+ , nous avons vérifié si elle pouvait également prévenir le clivage de la protéine PARP.

La figure III.19 présente le film de révélation du Western blot de la protéine PARP. On observe que la molécule MRC2P119 à 10^{-3} M inhibe fortement le clivage de la protéine PARP en fragment de 85 kDa induit par le MPP^+ . Ce résultat confirme la protection apportée par la molécule MRC2P119 que nous avons observée en suivant l'activation des caspases

E) Mesure de la fragmentation de l'ADN

Comme la molécule MRC2P119 peut prévenir l'activation des caspases, nous avons également étudié si elle pouvait également empêcher la fragmentation de l'ADN induite par le MPP^+ . La figure III.20 présente l'effet de la molécule MRC2P119 sur la fragmentation de l'ADN induite par le MPP^+ après 16 heures et 24 heures d'incubation. On observe que le MPP^+ induit une fragmentation de l'ADN d'autant plus importante que le temps d'incubation est long. Par ailleurs, la présence de la molécule MRC2P119 avant l'ajout du MPP^+ inhibe cette augmentation, et ce, de façon dépendante de la concentration avec respectivement 87,6 % et 74 % de protection à 10^{-3} M pour 16 heures et 24 heures d'incubation en présence de MPP^+ 2,5 mM. Ces expériences confirment l'effet protecteur observé lors des expériences réalisées en mesurant l'activité des caspases

F) Mesure du potentiel de membrane mitochondrial

La figure III.21 présente l'effet de la molécule MRC2P119 sur le potentiel de membrane mitochondrial. Comme attendu, le FCCP, utilisé comme contrôle positif, diminue fortement le potentiel de membrane mitochondrial et ce, à la fois en présence ou en absence de sérum. De plus, comme noté précédemment, une incubation de 3 heures avec 2,5 mM de MPP^+ ne provoque pas de chute nette du potentiel de membrane mitochondrial. Il est cependant intéressant de remarquer que la molécule MRC2P119 seule semble augmenter le

potentiel de membrane mitochondrial. Cet effet est moins marqué en présence de MPP^+ . Après une incubation de 8 heures, le MPP^+ diminue de 34 % le potentiel de membrane mitochondrial par rapport au contrôle correspondant (CTL SS). La molécule MRC2P119 seule augmente toujours ce potentiel de membrane. De plus, à 10^{-3} M, elle est capable d'inhiber la chute du potentiel de membrane mitochondrial provoquée par le MPP^+ . Ces résultats indiquent que la molécule MRC2P119 peut empêcher la perte de l'intégrité de la membrane mitochondriale induite par le MPP^+ .

Les expériences réalisées dans cette troisième partie du travail ont permis de mettre en évidence l'effet protecteur de la molécule MRC2P119 contre la toxicité induite par le MPP^+ . Cette toxine provoque la mort cellulaire par apoptose chez les cellules SHSY5Y. La présence de la molécule MRC2P119 prévient l'induction des principales caractéristiques menant à l'apoptose telles que l'activation des caspases, et le clivage d'un de leurs substrats (PARP). Elle prévient également les étapes finales de l'apoptose que sont la fragmentation de l'ADN et la chute du potentiel de membrane mitochondrial.

Conclusions et perspectives

La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative caractérisée principalement par des tremblements, de l'akinésie et de la rigidité. Elle touche un nombre élevé de personnes dans les pays occidentalisés. Cependant, l'étiologie de cette maladie reste encore controversée. De nombreuses études *post mortem* montrent que les cellules nerveuses dopaminergiques meurent par apoptose chez les patients atteints de la maladie de Parkinson ((Kitamura et al. 1998); (Hartmann et al. 2001)). De plus, un dysfonctionnement du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale a été souvent observé chez ces patients (Greenamyre et al. 1999). On ne sait cependant pas si ce dysfonctionnement est une des causes de la mort neuronale.

Au cours de ce travail, nous avons voulu mettre au point un modèle d'apoptose *in vitro* de la maladie de Parkinson qui permettrait de mieux comprendre l'induction de la mort et sur lequel on pourrait tester des molécules potentiellement protectrices. Pour ce faire, nous avons choisi les cellules SH-SY5Y issues d'un neuroblastome humain. Les cellules ont été intoxiquées avec le MPP⁺. Le MPP⁺ est un inhibiteur du complexe I qui peut conduire à l'apparition de symptômes parkinsoniens chez l'homme et dans des modèles animaux (Nakamura et al. 2000). Il est donc souvent considéré comme un modèle de choix pour étudier les causes de la maladie de Parkinson ou pour tester des molécules à potentiel thérapeutique. En parallèle, nous avons étudié l'effet de la roténone, un autre inhibiteur du complexe I qui peut également conduire chez le rat au développement de symptômes similaires à ceux observés chez les patients (Betarbet et al. 2000). Cet inhibiteur a été testé sur les cellules HepG2 issues d'un hépatome humain.

Comme la mort des neurones dopaminergiques observées chez les patients est une mort apoptotique, il nous semblait important de déterminer les conditions expérimentales qui induisaient également de l'apoptose.

L'apoptose est caractérisée par une activation des caspases. Ces protéases vont ensuite cliver différents substrats qui vont engendrer le phénotype apoptotique. Parmi ces substrats, on retrouve des endonucléases capables de fragmenter l'ADN en fragments d'environ 180 pb ou un multiple de 180 pb. Ce sont ces processus que nous avons suivis expérimentalement pour caractériser l'apoptose des cellules.

Dans la première partie de ce travail, nous avons donc tenté de mettre au point des conditions expérimentales induisant l'apoptose des cellules. Nous avons ainsi étudié l'effet de différentes concentrations en inhibiteur (MPP^+ ou roténone), l'effet de durées croissantes d'incubation et l'effet de la présence ou de l'absence de sérum pendant l'incubation. En effet, la présence de sérum retarde l'apparition du processus d'apoptose.

Le sérum utilisé pour la culture cellulaire contient entre autres des facteurs de croissance et des interleukines. Or, nous avons vu dans l'introduction que l'IL-3 ou les facteurs de croissance, par exemple, peuvent se fixer aux cellules grâce à un récepteur situé dans la membrane plasmique. Il s'en suit une transduction du signal qui aboutit à l'activation de la kinase Akt. Cette kinase phosphoryle Bad, une protéine pro-apoptotique qui ne peut alors plus interagir au niveau de la membrane mitochondriale externe où elle est capable d'initier l'apoptose. La phosphorylation de Bad inhibe donc son action pro-apoptotique (Kelekar et al. 1998). En retirant le sérum du milieu de culture, on enlève ainsi les facteurs externes favorisant la survie de la cellule, Akt n'est plus activée et Bad n'est plus phosphorylé. Il peut alors se fixer à Bax au niveau de la membrane mitochondriale externe et induire l'apoptose.

Les résultats obtenus dans ce travail montrent que le MPP^+ à une concentration de 2,5 mM induit la mort cellulaire par apoptose. En effet, une activation des caspases est détectée après 4 heures d'incubation. Les études réalisées en révélant la caspase-3 active par immunofluorescence montrent que la plupart des cellules sont touchées. L'activation des caspases est un processus qui se déroule tôt au cours de l'apoptose. Quatre heures d'incubation en présence du MPP^+ suffisent pour obtenir une augmentation de l'activation des caspases. Par contre, Uehara et al ont montré que le clivage de PARP coïncidait avec l'augmentation de la fragmentation de l'ADN et que ces processus sont plus tardifs (Uehara et al. 1999). De fait, un temps d'incubation de 16 heures des cellules en présence de MPP^+ engendre le clivage de PARP puisque le fragment de 85 kDa résultant de ce clivage est détectable par Western blot dans ces conditions. De plus, c'est aussi après 16 heures d'incubation avec le MPP^+ que l'on observe une augmentation importante de la fragmentation de l'ADN.

Il a été montré à plusieurs reprises dans la littérature que le MPP^+ pouvait induire l'apoptose des cellules. En effet, Kitamura et al ont pu mettre en évidence certaines caractéristiques de l'apoptose lorsque des cellules SH-SY5Y étaient incubées en présence MPP^+ 1 mM pendant 3 jours en présence de sérum, notamment l'activation des caspases, le clivage d'un de leurs substrats, PARP et l'augmentation de l'expression de p53 (Kitamura et al.

1998). Cassarino et al ont , quant à eux, découvert que le MPP⁺ pouvait agir directement sur les mitochondries et induire l'ouverture des mégapores insérés en membrane mitochondriale(Cassarino et al. 1999). Ces résultats confirment ceux que nous avons obtenus.

Dans le but de comprendre comment le MPP⁺ pouvait initier l'apoptose, nous avons suivi l'évolution du potentiel de membrane mitochondrial au cours du temps. En effet, comme le MPP⁺ est un inhibiteur de la chaîne respiratoire mitochondriale, on peut penser qu'il induirait une perte de gradient de protons établi de part et d'autre de la membrane mitochondriale interne et par conséquent, une diminution du potentiel de membrane mitochondrial. Cette diminution pourrait participer à l'ouverture des mégapores, engendrer la libération du cytochrome c et initier l'apoptose (Patel et al. 1998). Les résultats que nous avons obtenus montrent qu'on n'observe pas de chute du potentiel de membrane mitochondrial après 3 heures d'incubation des cellules en présence de MPP⁺. Une incubation de 3 heures correspond à la phase d'initiation puisqu'une activation des caspases est détectée à 4 heures. Par contre, une diminution de 34 % de ce potentiel est observée après 8 heures, c'est-à-dire bien après que les caspases aient été activées. Cela suggère que la chute du potentiel de membrane mitochondrial serait une conséquence et non une cause de l'apoptose. Plusieurs études montrent que la chute du potentiel de membrane peut être déclenchée tardivement au cours de l'apoptose (Krohn et al. 1999) (Kroemer et al. 2000) (Green et al. 1998). Green et Kroemer (Green et al. 1998) proposent que les caspases actives ou leurs substrats pourraient agir sur les mégapores, initier leur ouverture et provoquer la chute du potentiel de membrane mitochondrial. C'est probablement ce processus que nous avons détecté dans les cellules SH-SY5Y incubées en présence de MPP⁺.

Si le MPP⁺ est un inhibiteur du complexe I, il peut aussi engendrer la mort cellulaire par d'autres mécanismes. Le MPP⁺ peut en effet augmenter la production d'espèces réactives dérivées de l'oxygène (Olanow et al. 1999) (Nakamura et al. 2000). Ces espèces peuvent provoquer des dommages oxydants et induire la mort des cellules. Le MPP⁺ agit également sur l'activation de certaines protéines comme la JNK en modifiant l'état de phosphorylation de cette protéine ce qui entraîne l'induction de l'apoptose (Xia et al. 2001). Des études supplémentaires devraient être réalisées pour déterminer le mécanisme exact par lequel le MPP⁺ induit l'apoptose dans nos conditions expérimentales.

Disposant d'un modèle d'apoptose induite dans les cellules de neuroblastomes par une molécule capable d'engendrer des symptômes de type parkinsonien, nous avons voulu utiliser ce modèle pour tester une molécule potentiellement protectrice. Des études faites au laboratoire ont permis de mettre en évidence l'effet protecteur de la molécule MRC2P119 sur l'induction de la perte de viabilités cellules SH-SY5Y incubées sous hypoxie. Cette molécule possède une activité anti-ischémique sur les cellules endothéliales et les neuroblastomes (Bouaziz 2001). L'activité de la molécule MRC2P119 se marque par une augmentation de l'activité du complexe I et du taux de respiration, ce qui permet une inhibition de la diminution du contenu en ATP des cellules lorsque celles-ci sont exposés à des conditions d'hypoxie. Cette protection a été attribuée à une protection de l'inhibition de la respiration par le manque d'oxygène (Bouaziz 2001). Comme cette molécule agit sur le complexe I, nous avons voulu voir si elle pouvait également empêcher l'inhibition du complexe I induite par le MPP⁺ et protéger les cellules de l'apoptose induite par cet inhibiteur.

Les résultats montrent que la molécule MRC2P119 protège les cellules de l'apoptose induite par le MPP⁺. On observe ainsi une inhibition par la molécule MRC2P119 de l'activation des caspases et de la fragmentation de l'ADN. Cette inhibition est d'autant plus importante que la concentration en molécule est grande. Il est de plus important de noter que cette protection touche l'entièreté de la population cellulaire. En effet, on observe dans les études réalisées en immunofluorescence une diminution de la quantité de caspase-3 en présence de MPP⁺ dans la plupart des cellules.

Les études précédentes réalisées sur l'effet du MPP⁺ avaient mis en évidence que cet inhibiteur engendrait une diminution du potentiel de membrane mitochondrial, qui s'observait tardivement au cours du processus d'apoptose. Cette diminution serait donc la conséquence de l'apoptose plutôt que d'être impliquée dans l'initiation de celle-ci. L'effet de la molécule MRC2P119 a également été testé sur cette diminution du potentiel de membrane mitochondrial induite par le MPP⁺ et une nette protection a été constatée. Ces résultats indiquent à nouveau que la molécule MRC2P119 peut inhiber la mort cellulaire des cellules induites par le MPP⁺. Au cours de ces expériences, nous avons également remarqué que la molécule MRC2P119 pouvait à elle seule augmenter le potentiel de membrane mitochondrial, que ce soit après 3 ou 8 heures d'incubation. Cette observation est très intéressante, elle est probablement à mettre en relation avec le fait que la cible biochimique de la molécule MRC2P119 est le complexe I de la chaîne respiratoire. Bouaziz et al ont mis en évidence une augmentation de l'activité du complexe I lorsque les mitochondries isolées à partir de foie de rat sont incubées en présence de la molécule MRC2P119 (Bouaziz 2001). Cette augmentation

de l'activité du complexe I provoque une extrusion de protons plus grande et donc probablement une augmentation du potentiel de membrane mitochondrial.

Ces résultats sont très encourageants car peu de molécules ont à ce jour été décrites qui pouvaient protéger les cellules de la toxicité du MPP⁺. Kitamura et al observent que le talipexole, un agoniste des récepteurs à la dopamine D₂/D₂ et le pramipexole, un agoniste des récepteur D₂/D₃ pouvaient protéger les cellules SH-SY5Y de l'apoptose induite par le MPP⁺. Ils attribuent cependant cette protection à la capacité qu'auraient ces inhibiteurs de trapper les espèces réactives dérivées de l'oxygène plutôt qu'à son effet sur le récepteur. Une protection par d'autres molécules anti-oxydantes a également été observée (Mazzio et al. 2001).

D'autres familles de molécules apportent également une protection in vivo. Ainsi, le riluzole, un composé anti-glutaminergique, atténue la neurotoxicité induite par le MPP⁺ chez les souris (Araki et al. 2001) et chez le singe (Boraud et al. 2000). La molécule anti-oxydante phényl N-tertbulylnitrone (PBN) protège également contre la perte des neurones induites par le MPTP chez la souris (Fallon et al. 1997). Par ailleurs il est très intéressant de noter que les résultats très encourageants ont été observés lorsque les souris intoxiquées au MPTP sont traitées avec de l'extrait de *Ginkgo biloba* (Wu et al. 1999) (Yang et al. 2001). C'est à partir de cet extrait que le bilobalide, la molécule parente de la molécule MRC2P119, a été isolée.

Une autre molécule, le ropinirole, un agoniste dopaminergique fait l'objet d'études cliniques. Ces études révèlent que le ropinirole est aussi efficace que la lévodopa. Cependant, elle n'a pas d'effet sur les patients atteints récemment de la maladie de Parkinson. De plus, des effets indésirables suite à la prise de ropinirole apparaissent comme des céphalées, de l'insomnie et de l'oedème des membres inférieurs. D'autres études doivent donc encore être réalisées afin d'améliorer l'efficacité des médicaments anti-parkinsoniens.

Ainsi, sur base de ce travail, il serait intéressant de développer une étude in vivo afin de déterminer l'effet protecteur éventuel de la molécule MRC2P119, en utilisant par exemple le modèle d'intoxication des souris par le MPTP. Cette étude pourrait servir de première étape en vue, si les résultats sont encourageants, de développer un nouveau médicament anti-parkinsonien.

Bibliographie

- Ameisen (1996). "Le suicide des cellules." Pour la science **224**: 52-59.

- Araki, T., Y. Muramatsu, K. Tanaka, M. Matsubara and Y. Imai (2001). "Riluzole (2-amino-6-trifluoromethoxy benzothiazole) attenuates MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) neurotoxicity in mice." Neurosci. Lett. **312**(1): 50-54.

- Betarbet, R., T. B. Sherer, G. MacKenzie, M. Garcia-Osuna, A. V. Panov and J. T. Greenamyre (2000). "Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease." Nat. Neurosci. **3**(12): 1301-1306.

- Boraud, T., E. Bezard, J. M. Stutzmann, B. Bioulac and C. E. Gross (2000). "Effects of riluzole on the electrophysiological activity of pallidal neurons in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated monkey." Neurosci. Lett. **281**(2-3): 75-78.

- Bossy-Wetzel, E. and D. R. Green (1999). "Apoptosis: checkpoint at the mitochondrial frontier." Mutat. Res. **434**(3): 243-251.

- Bouaziz, M., Remacle (2001). "Etude des effets du MPP+: Effet sur la respiration mitochondriale."

- Bousquet (1995). "un suicide sous contrôle." biofutur: 16-22.

- Cassarino, D. S., J. K. Parks, W. D. Parker, Jr. and J. P. Bennett, Jr. (1999). "The parkinsonian neurotoxin MPP+ opens the mitochondrial permeability transition pore and releases cytochrome c in isolated mitochondria via an oxidative mechanism." Biochim. Biophys. Acta. **1453**(1): 49-62.

- Chandel, N. S. and P. T. Schumacker (2000). "Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight." J. Appl. Physiol. **88**(5): 1880-1189.

- Conn, K. J., M. D. Ullman, P. B. Eisenhauer, R. E. Fine and J. M. Wells (2001). "Decreased expression of the NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) subunit 4 in 1-methyl-4-phenylpyridinium -treated human neuroblastoma SH-SY5Y cells." Neurosci. Lett. **306**(3): 145-180.
- Dragovich, T., C. M. Rudin and C. B. Thompson (1998). "Signal transduction pathways that regulate cell survival and cell death." Oncogene **17**(25): 3207-3213.
- Fallon, J., R. T. Matthews, B. T. Hyman and M. F. Beal (1997). "MPP+ produces progressive neuronal degeneration which is mediated by oxidative stress." Exp. Neurol. **144**(1): 193-198.
- Green, D. and G. Kroemer (1998). "The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria?" Trends Cell. Biol. **8**(7): 267-271.
- Greenamyre, J. T., G. MacKenzie, T. I. Peng and S. E. Stephans (1999). "Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease." Biochem. Soc. Symp. **66**: 85-97.
- Hartmann, A., S. Hunot, P. P. Michel, M. P. Muriel, S. Vyas, B. A. Faucheux, A. Mouatt-Prigent, H. Turmel, A. Srinivasan, M. Ruberg, G. I. Evan, Y. Agid and E. C. Hirsch (2000). "Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **97**(6): 2875-2880.
- Hartmann, A., P. P. Michel, J. D. Troadec, A. Mouatt-Prigent, B. A. Faucheux, M. Ruberg, Y. Agid and E. C. Hirsch (2001). "Is Bax a mitochondrial mediator in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease?" J. Neurochem. **76**(6): 1785-1793.
- Hengartner, M. O. (2000). "The biochemistry of apoptosis." Nature **407**(6805): 770-776.
- Huang, Y., S. Nakada, T. Ishiko, T. Utsugisawa, R. Datta, S. Kharbanda, K. Yoshida, R. V. Talanian, R. Weichselbaum, D. Kufe and Z. M. Yuan (1999). "Role for caspase-mediated cleavage of Rad51 in induction of apoptosis by DNA damage." Mol. Cell. Biol. **19**(4): 2986-2997.

- Jacobson, M. D., M. Weil and M. C. Raff (1997). "Programmed cell death in animal development." Cell **88**(3): 347-354.
- Kaufmann, S. H. and M. O. Hengartner (2001). "Programmed cell death: alive and well in the new millennium." Trends Cell Biol. **11**(12): 526-534.
- Kelekar, A. and C. B. Thompson (1998). "Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis." Trends Cell Biol. **8**(8): 324-330.
- King, T. D., G. N. Bijur and R. S. Jope (2001). "Caspase-3 activation induced by inhibition of mitochondrial complex I is facilitated by glycogen synthase kinase-3beta and attenuated by lithium." Brain Res. **919**(1): 106-114.
- Kitamura, Y., T. Kosaka, J. I. Kakimura, Y. Matsuoka, Y. Kohno, Y. Nomura and T. Taniguchi (1998). "Protective effects of the antiparkinsonian drugs talipexole and pramipexole against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced apoptotic death in human neuroblastoma SH-SY5Y cells." Mol. Pharmacol. **54**(6): 1046-1054.
- Kroemer, G. and J. C. Reed (2000). "Mitochondrial control of cell death." Nat. Med. **6**(5): 513-519.
- Krohn, A. J., T. Wahlbrink and J. H. Prehn (1999). "Mitochondrial depolarization is not required for neuronal apoptosis." J. Neurosci. **19**(17): 7394-7404.
- Lotharius, J. and K. L. O'Malley (2000). "The parkinsonism-inducing drug 1-methyl-4-phenylpyridinium triggers intracellular dopamine oxidation. A novel mechanism of toxicity." J. Biol. Chem. **275**(49): 38581-38588.
- May (1998). "Apoptose: perspectives et promesses." médecine/sciences **14**: 6-8.
- Mazzio, E., J. Huber, S. Darling, N. Harris and K. F. Soliman (2001). "Effect of antioxidants on L-glutamate and N-methyl-4-phenylpyridinium ion induced-neurotoxicity in PC12 cells." Neurotoxicology **22**(2): 283-288.

- Mc Cance, K. and S. Huether Pathophysiology. Pathophysiology. Mosby.
- Mignon, r., joulin (1998). "Les caspases, les protéases à cystéine de l'apoptose: un enjeu thérapeutique pour demain?" médecine/sciences **14**: 9-17.
- Miyako, K., T. Irie, T. Muta, S. Umeda, Y. Kai, T. Fujiwara, K. Takeshige and D. Kang (1999). "1-Methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) selectively inhibits the replication of mitochondrial DNA." Eur. J. Biochem. **259**(1-2): 412-418.
- Miyako, K., Y. Kai, T. Irie, K. Takeshige and D. Kang (1997). "The content of intracellular mitochondrial DNA is decreased by 1-methyl- 4-phenylpyridinium ion (MPP+)." J. Biol. Chem. **272**(15): 9605-9608.
- Mizuno, Y., N. Sone, K. Suzuki and T. Saitoh (1988). "Studies on the toxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) against mitochondria of mouse brain." J. Neurol. Sci. **86**(1): 97-110.
- Nakamura, K., V. P. Bindokas, J. D. Marks, D. A. Wright, D. M. Frim, R. J. Miller and U. J. Kang (2000). "The selective toxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium to dopaminergic neurons: the role of mitochondrial complex I and reactive oxygen species revisited." Mol. Pharmacol. **58**(2): 271-278.
- Nunez, G., M. A. Benedict, Y. Hu and N. Inohara (1998). "Caspases: the proteases of the apoptotic pathway." Oncogene **17**(25): 3237-3245.
- Olanow, C. W. and W. G. Tatton (1999). "Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease." Annu. Rev. Neurosci. **22**: 123-144.
- Parker, R., Swerdlow (1998). "Mitochondrial genetic '98 Mitochondrial dysfunction in idiopathic Parkinson Disease." Am. J. Hum. Genet. **62**: 758-762.

- Parker, W. D., Jr., J. Parks, C. M. Filley and B. K. Kleinschmidt-DeMasters (1994).
“Electron transport chain defects in Alzheimer's disease brain.” Neurology **44**(6):
1090-1096.

- Patel, A. J., I. Lauritzen, M. Lazdunski and E. Honore (1998). “Disruption of mitochondrial
respiration inhibits volume-regulated anion channels and provokes neuronal cell
swelling.” J. Neurosci. **18**(9): 3117-3123.

- Piret, J. P., B. Fuks, P. Chatelain, J. Remacle and C. Michiels (2002). “Apoptotic pathway
initiated by ter-butyl hydroperoxide in hepatoma HepG2 cells.” Life sciences
(soumis).

- Reed, J. C. (1998). “Bcl-2 family proteins.” Oncogene **17**(25): 3225-3236.

- Saikumar, P., Z. Dong, V. Mikhailov, M. Denton, J. M. Weinberg and M. A. Venkatachalam
(1999). “Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease.” Am. J. Med.
107(5): 489-506.

- Scaduto, R. C., Jr. and L. W. Grotyohann (1999). “Measurement of mitochondrial
membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives.” Biophys. J. **76**(1 Pt 1):
469-477.

- Schapira (1998). “Mitochondrial involment in Parkinson's disease, Huntington's disease,
hereditary spastic paraplegia and Friedreich's ataxia.” Biochimica et Biophysica Acta:
159-170.

- Schapira, A. H., J. M. Cooper, D. Dexter, J. B. Clark, P. Jenner and C. D. Marsden (1990).
“Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease.” J Neurochem **54**(3):
823-7.

- Schorderet, M. (1992). Pharmacologie. Pharmacologie.

- Sheenan, N. (2000). “La maladie de Parkinson Certitudes et controverses
pharmacothérapeutiques (première partie).” Pharmactuel **33**: 36-46.

- Sherer, T. B., P. A. Trimmer, K. Borland, J. K. Parks, J. P. Bennett, Jr. and J. B. Tuttle (2001). "Chronic reduction in complex I function alters calcium signaling in SH-SY5Y neuroblastoma cells." Brain Res. **891**(1-2): 94-105.
- Siau, S. (2000). "Maladie de Parkinson." Neurology **113**: 10-16.
- Swerdlow, R. H., J. K. Parks, S. W. Miller, J. B. Tuttle, P. A. Trimmer, J. P. Sheehan, J. P. Bennett, Jr., R. E. Davis and W. D. Parker, Jr. (1996). "Origin and functional consequences of the complex I defect in Parkinson's disease." Ann. Neurol. **40**(4): 663-671.
- Thiffault, C., J. W. Langston and D. A. Di Monte (2000). "Increased striatal dopamine turnover following acute administration of rotenone to mice." Brain Res. **885**(2): 283-288.
- Triepels, R. H., L. P. Van Den Heuvel, J. M. Trijbels and J. A. Smeitink (2001). "Respiratory chain complex I deficiency." Am. J. Med. Genet. **106**(1): 37-45.
- Uehara, T., Y. Kikuchi and Y. Nomura (1999). "Caspase activation accompanying cytochrome c release from mitochondria is possibly involved in nitric oxide-induced neuronal apoptosis in SH-SY5Y cells." J. Neurochem. **72**(1): 196-205.
- Voet, D. and J. Voet (1998). Biochimie. Biochimie. D. Université.
- Wallace, D. C. (2001). "Mouse models for mitochondrial disease." Am. J. Med. Genet. **106**(1): 71-93.
- Wu, W. and X. Zhu (1999). "Involvement of monoamine oxidase inhibition in neuroprotective and neurorestorative effects of Ginkgo biloba against MPTP-induced nigrostriatal dopaminergic toxicity in C57 mice." Life sciences **65**: 157-164.

- Xia, X. G., T. Harding, M. Weller, A. Bieneman, J. B. Uney and J. B. Schulz (2001). "Gene transfer of the JNK interacting protein-1 protects dopaminergic neurons in the MPTP model of Parkinson's disease." Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. **98**(18): 10433-10438.

- Yang, S. F., Q. Wu, A. S. Sun, X. N. Huang and J. S. Shi (2001). "Protective effect and mechanism of Ginkgo biloba leaf extracts for Parkinson disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine." Acta. Pharmacol. Sin. **22**(12): 1089-1093.

Liste des abréviations

Ac	Anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénine diphosphate
AIF	Apoptosis inducing factor
ANT	Adénine nucléotide translocase
Apaf-1	Apoptosis protease activating factor
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BSA	Bovine serum albumin
CAD	Caspase-activated deoxiribonuclease
CARD	Caspase activation et recruitment domain
Ced	Cell death
COMT	Cathécol-o-méthyl-transférase
CTL	Contrôle
DD	Death domain
DED	Death effector domain
DFF	DNA fragmentation factor
DHPA	3,4-dihydrophénylacétique
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FADD	Fas-associated death domain protein
FCCP	Carbonylcyanide-p-trifluorométhoxyphénylhydrazone
FMN	Flavine mononucléotide
HBSS	Hank's buffer saline solution
Hepes	Hydroxyethyl piperazine-ethane sulfonic acid
IAP	Inhibitor of apoptosis protein
ICAD	Inhibitor of CAD
ICE	Interleukine 1 β converting enzyme
IgG	Immunoglobuline G

IL-3	Interleukine 3
JNK	c-jun N-terminal kinase
kb	Kilobases
kDa	KiloDalton
LDH	Lactate déshydrogénase
MAO	Monoamine oxydase
MAP	Mitogen Activated Protein
MPP ⁺	1-méthyl-4-phénylpyridinium
MPTP	1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridium
NAD ⁺	Nicotinamide Adenosine Dinucléotide phosphate (forme oxydée)
NF- κ B	Nuclear factor κ B
NOS	Nitric oxide synthase
PARP	Poly(ADP-ribose) polymérase
pb	Paire de bases
PBS	Phosphate Buffer Saline
PFA	Paraformaldéhyde
PTPC	Permeability transition pore complex
PVGF	Membrane de diofluorure de polyvinylidène
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SMAC	Second mitochondrial activator of caspase
TBS	Tris Buffer Saline
TEMED	N,N,N'-Tétra-méthyl-éthylènediamine
TMRE	Tétraméthyl rhodamine éthyl ester
TNF	Tumor necrosis factor
TNFR	TNT receptor
TRADD	TNFR- associated death domain
VDAC	Canal anionique voltage-dépendant
VMAT2	Transporteur monoamine vésiculaire

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix

FACULTE DES SCIENCES

Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Mise au point d'un modèle d'apoptose in vitro de la maladie de Parkinson

MOREL Marina

Résumé

La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative caractérisée par la mort des cellules nerveuses dopaminergiques par apoptose. La cause exacte de cette dégénérescence est inconnue mais une inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale est observée dans ces cellules. Le but de ce travail est de mettre au point un modèle d'apoptose in vitro de la maladie de Parkinson qui permettrait de tester des molécules potentiellement protectrices.

Le modèle que nous avons choisi est l'intoxication des cellules de neuroblastome humain SH-SY5Y par le MPP⁺, un inhibiteur du complexe I capable d'engendrer les symptômes de type parkinsonien chez les animaux. Certaines mises au point du modèle concernant la concentration, la durée d'incubation et la présence ou l'absence de sérum ont été réalisées afin de développer le modèle expérimental. Ainsi, nous avons montré qu'une concentration de 2,5 mM en MPP⁺ induit l'apoptose des cellules lorsque celles-ci sont incubées en absence de sérum. On observe alors une activation des caspases, le clivage d'un de leurs substrats et la fragmentation de l'ADN. Nous avons ensuite testé la molécule MRC2P119, une molécule dérivée du bilobalide conçue au laboratoire. Cette molécule est capable d'augmenter l'activité du complexe I et possède des propriétés anti-ischémiques. La molécule MRC2P119, lorsqu'elle est présente pendant l'incubation des cellules en présence de MPP⁺, prévient complètement l'apparition des marqueurs de l'apoptose. Elle semble donc protéger les cellules des effets toxiques du MPP⁺. Elle pourrait à long terme peut-être être développée comme thérapeutique anti-parkinsonienne.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2002

Promoteur: C. Michiels

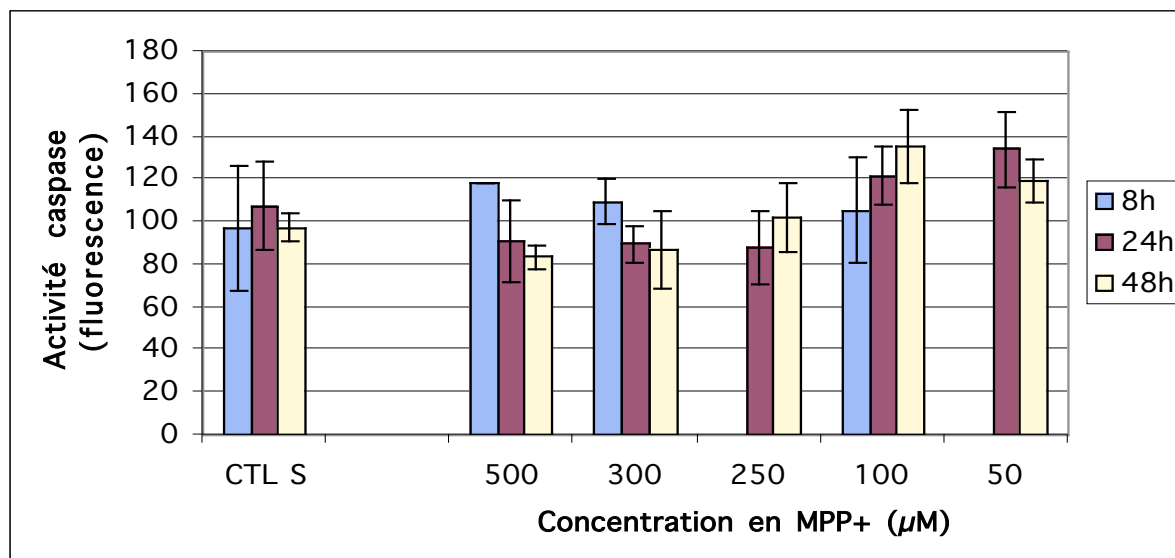


Figure III.1 Effet du MPP⁺ sur l'activité des caspases des cellules SH-SY5Y.

La mesure de l'activité des caspases est réalisée après 8, 24 et 48 heures d'incubation des cellules SH-SY5Y en présence ou en absence (CTL S) de concentrations croissantes en MPP⁺. Les résultats sont exprimés en tant que moyennes \pm un écart-type (n=3).

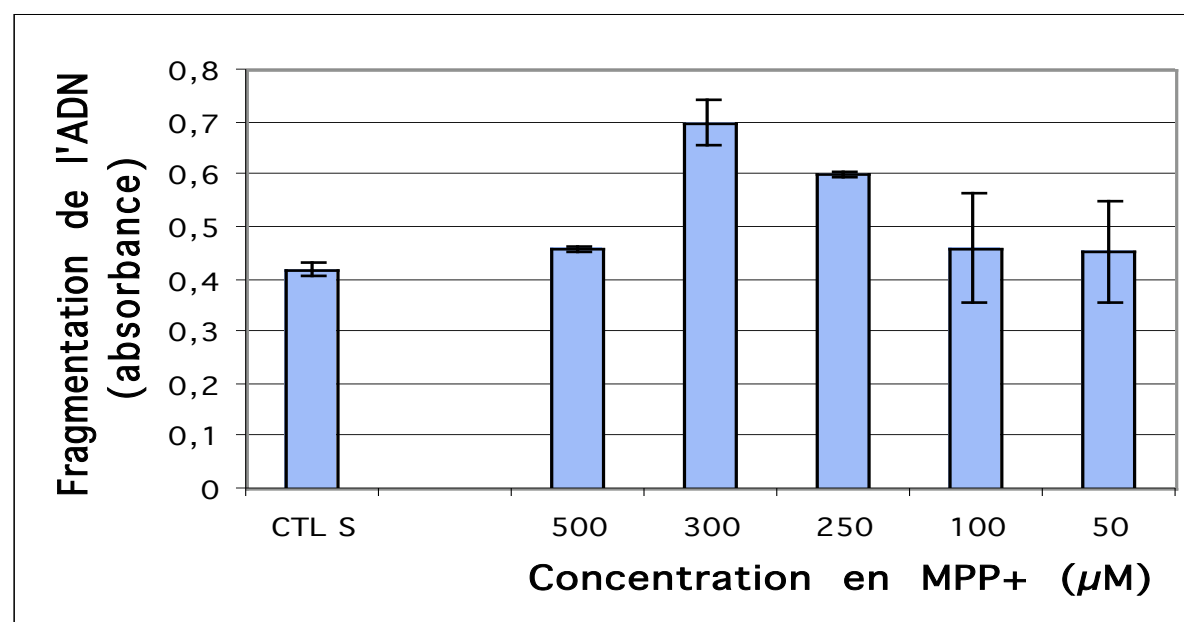


Figure III.2 Effet du MPP⁺ sur la fragmentation de l'ADN des cellules SH-SY5Y.

La mesure de la fragmentation de l'ADN est réalisée après 24 heures d'incubation des cellules SH-SY5Y en présence ou en absence (CTL S) de concentrations croissantes en MPP⁺. Les résultats sont exprimés en tant que moyennes \pm un écart-type (n=3).

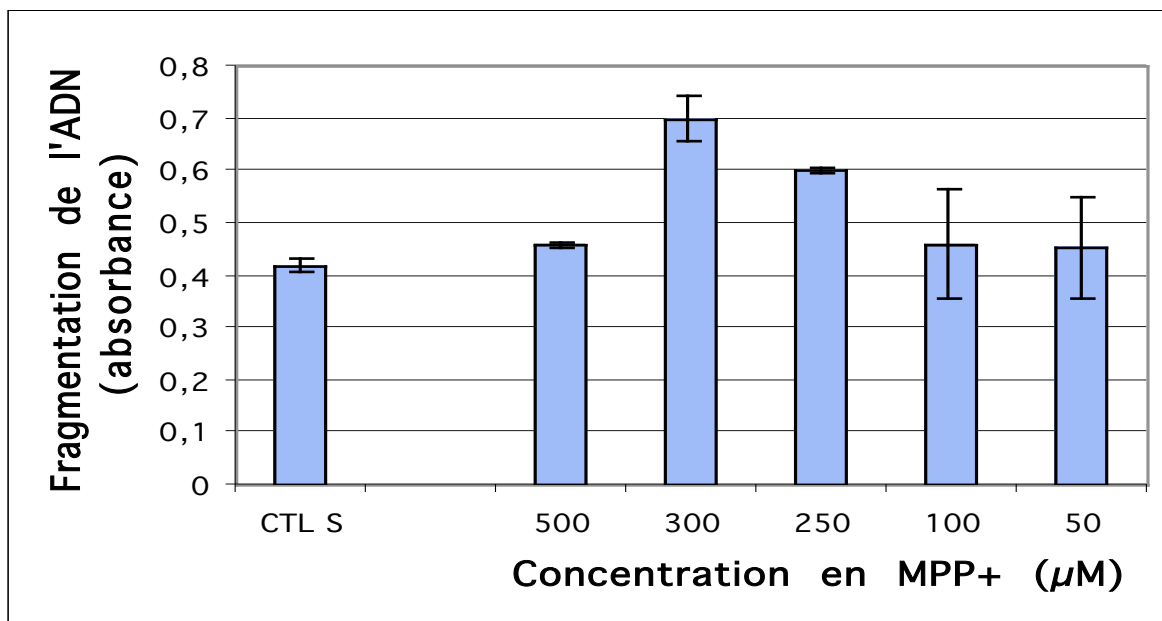


Figure III.2 Effet du MPP⁺ sur la fragmentation de l'ADN des cellules SH-SY5Y.

La mesure de la fragmentation de l'ADN est réalisée après 24 heures d'incubation des cellules SH-SY5Y en présence ou en absence (CTL S) de concentrations croissantes en MPP⁺. Les résultats sont exprimés en tant que moyennes ± un écart-type (n=3).

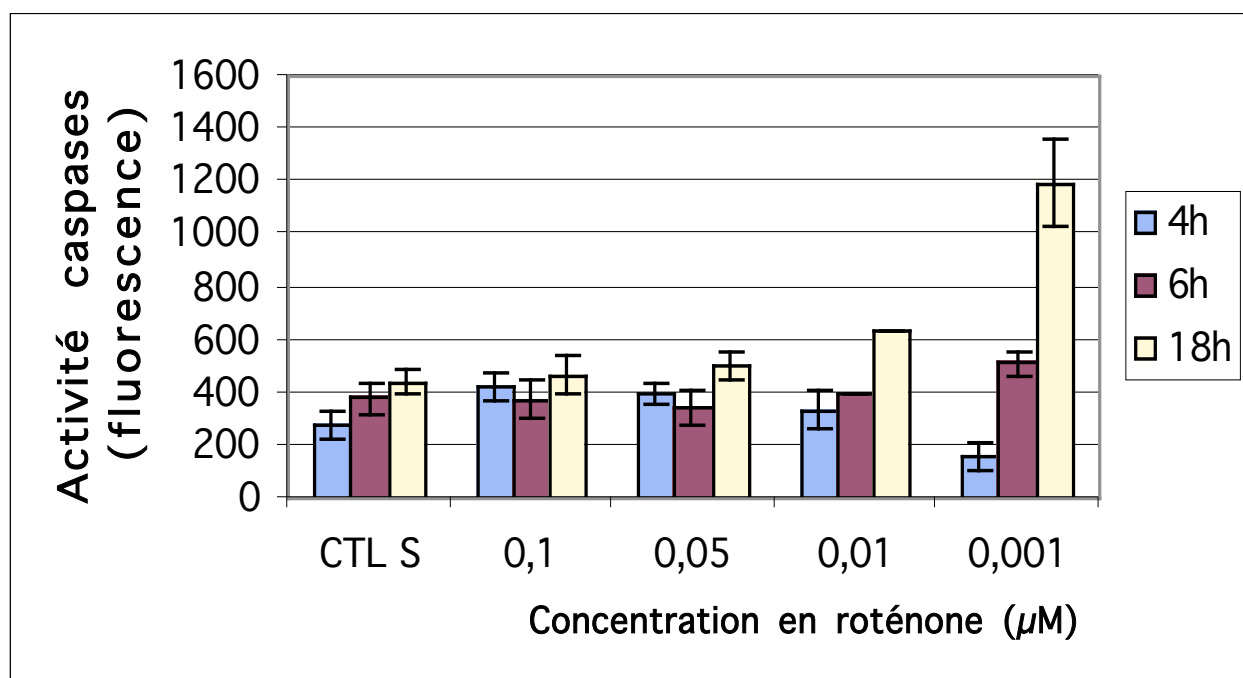


Figure III.3 Effet de la rotenone sur l'activité des caspases des cellules HepG2.

La mesure de l'activité des caspases est réalisée après 4, 6 et 18 heures d'incubation des cellules Hep G2 en présence ou en absence (CTL S) de concentrations croissantes en rotenone. Les résultats sont exprimés en tant que moyennes \pm un écart-type ($n=3$).

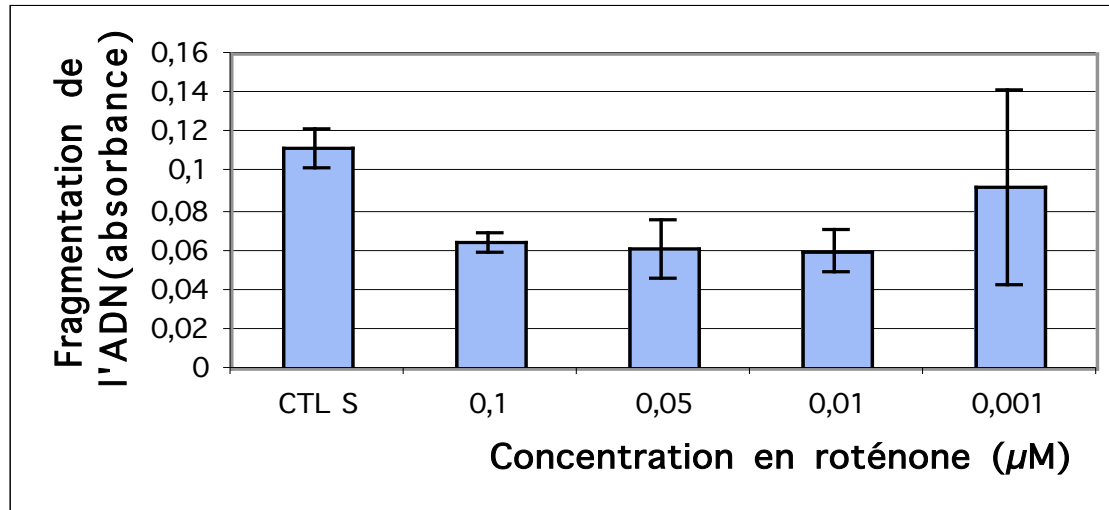


Figure III.4 Effet de la roténone sur la fragmentation de l'ADN des cellules HepG2.

La mesure de la fragmentation de l'ADN est réalisée après 24 heures d'incubation des cellules Hep G2 en présence ou en absence (CTL S) de concentrations croissantes en roténone. Les résultats sont exprimés en tant que moyennes \pm un écart-type (n=3).

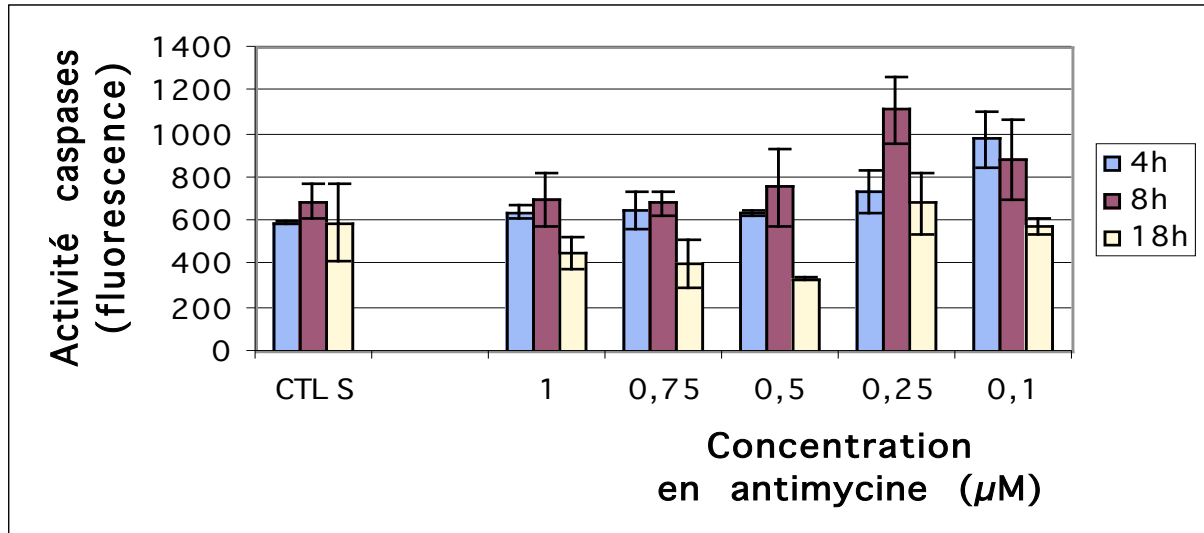


Figure III.5 Effet de l'antimycine sur l'activité des caspases des cellules HepG2.

La mesure de l'activité des caspases est réalisée après 4, 8 et 18 heures d'incubation des cellules en présence ou en absence (CTL S) de concentrations croissantes en antimycine. Les résultats sont exprimés en tant que moyennes \pm un écart-type (n=3).

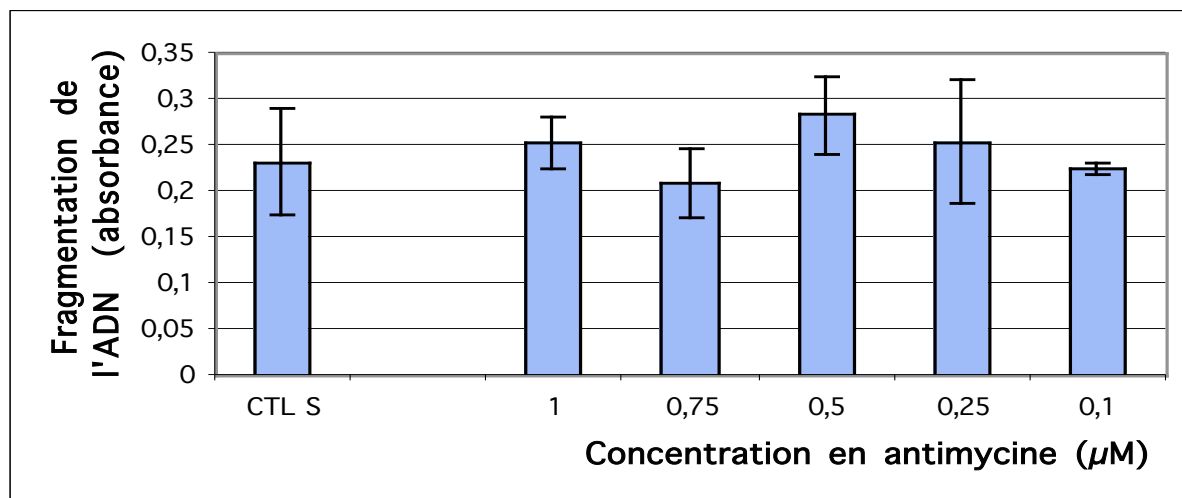


Figure III.6 Effet de l'antimycine sur la fragmentation de l'ADN des cellules HepG2.

La mesure de la fragmentation de l'ADN est réalisée après une incubation de 18 heures des cellules en présence ou en absence (CTL S) de concentrations croissantes en antimycine. Les résultats sont exprimés en tant que moyennes \pm un écart-type (n=3).

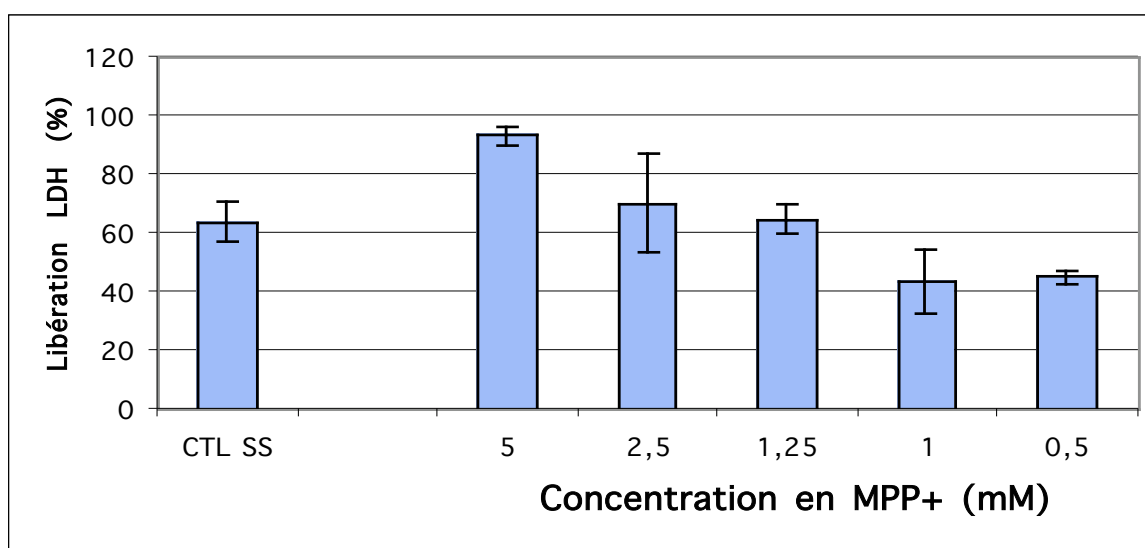


Figure III.7 Effet du MPP⁺ sur la libération de la lactate déshydrogénase chez les cellules SH-SY5Y. Une heure avant l'incubation du MPP⁺, le milieu est décanté et remplacé par du milieu DMEM sans sérum. La mesure de la libération de LDH est réalisée après une incubation de 18 heures des cellules en présence ou en absence (CTL SS) de concentrations croissantes en MPP⁺ dans le surnageant et dans le tapis cellulaire. Les résultats sont exprimés en pourcentages de libération en tant que moyennes \pm un écart-type (n=3).

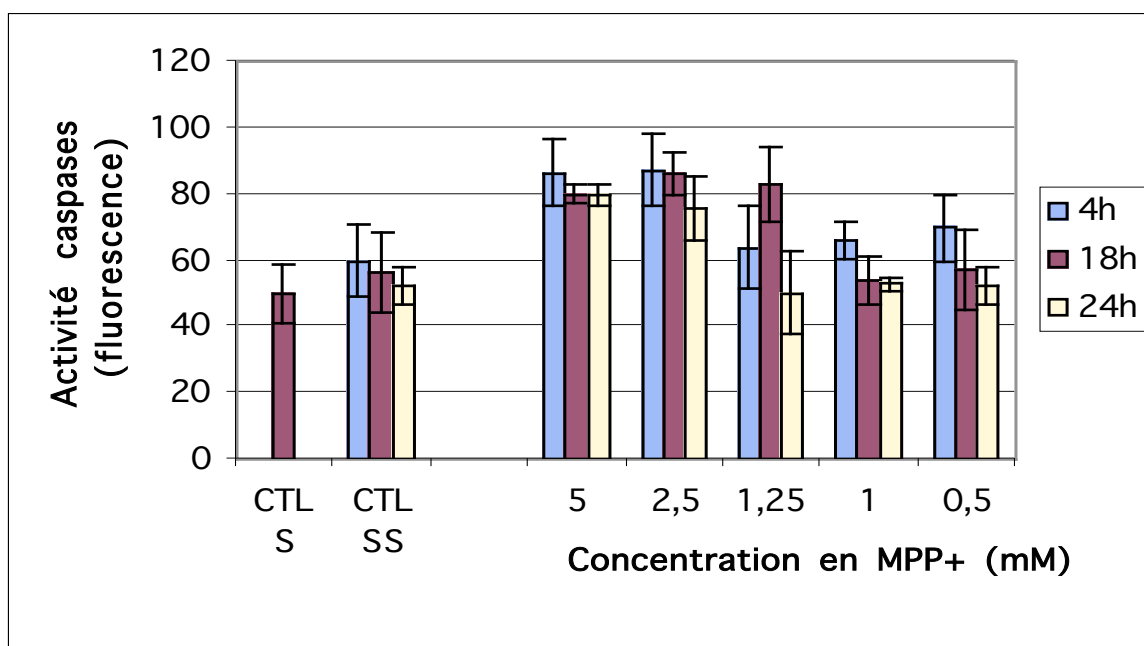


Figure III.8 Effet du MPP⁺ sur l'activité des caspases des cellules SH-SY5Y. Une heure avant l'incubation du MPP⁺, le milieu est décanté ou non (CTL S) et remplacé par du milieu sans sérum. La mesure de l'activité des caspases est réalisée après 4, 18 et 24 heures d'incubation des cellules en présence ou en absence (CTL SS) de concentrations croissantes en MPP⁺. Les résultats sont exprimés en tant que moyennes \pm un écart-type (n=3).

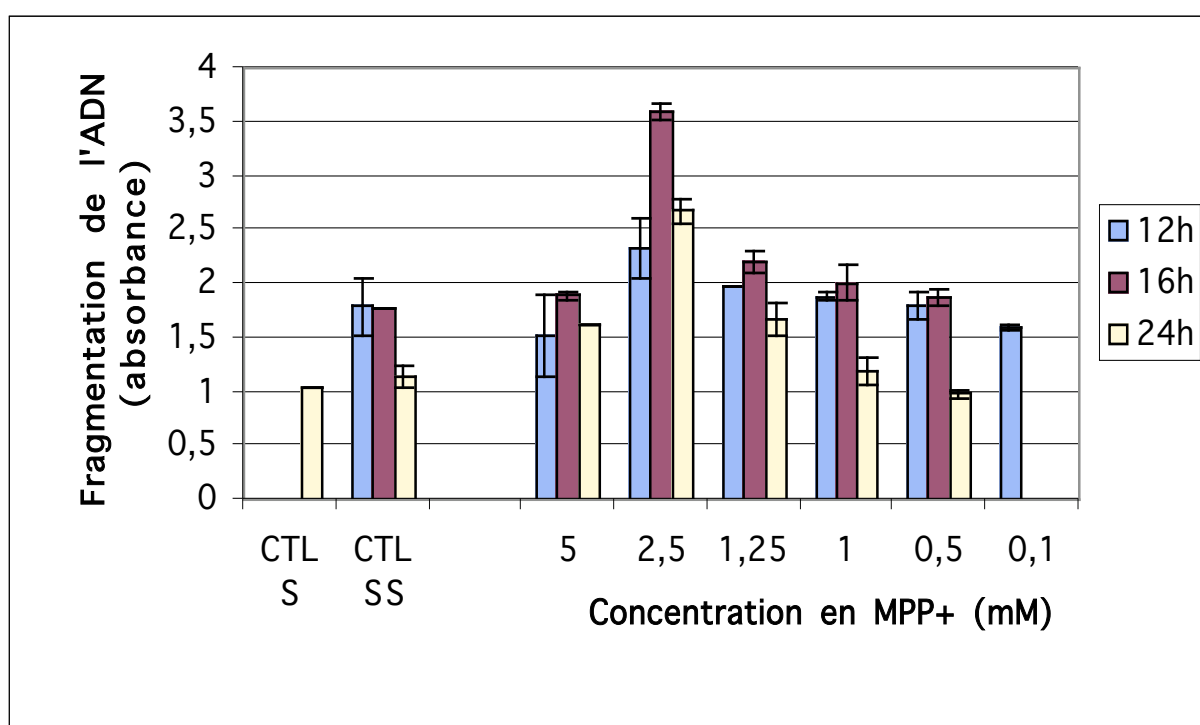


Figure III.11 Effet du MPP⁺ sur la fragmentation de l'ADN des cellules SH-SY5Y. Une heure avant l'incubation du MPP⁺, le milieu de culture est décanté ou non (CTL S) et remplacé par du milieu sans sérum. La mesure de la fragmentation de l'ADN est réalisée après 4, 16 et 24 heures d'incubation des cellules en présence ou en absence (CTL SS) de concentrations croissantes en MPP⁺. Les résultats sont exprimés en tant que moyennes \pm un écart-type (n=3).

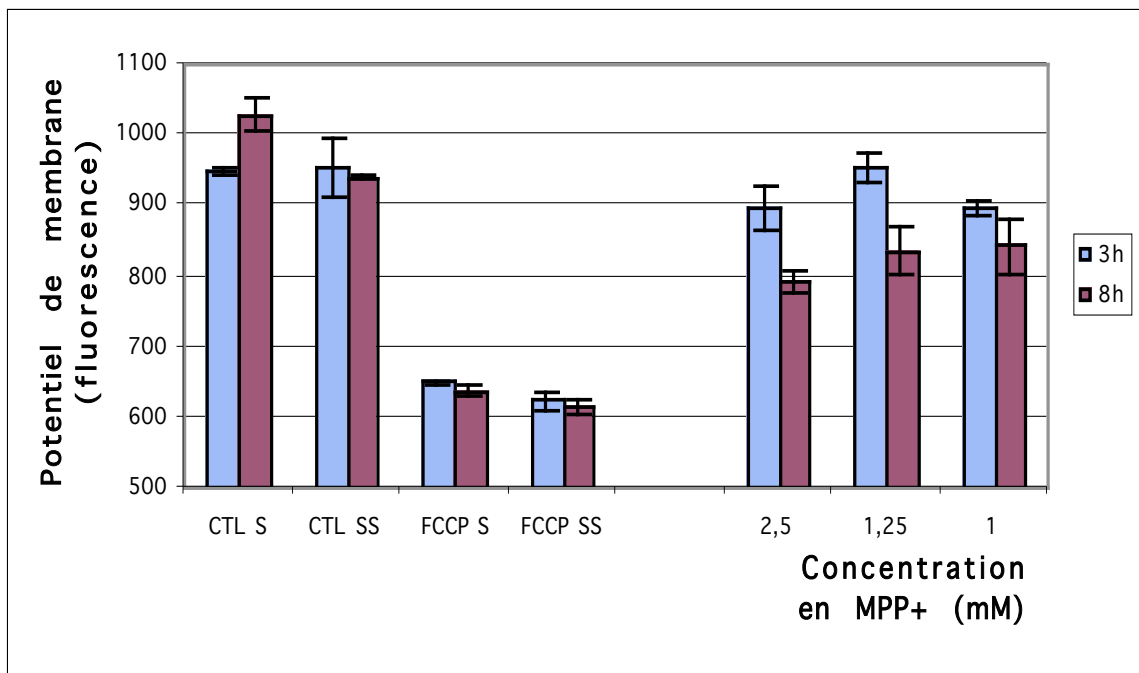


Figure III.12 Effet du MPP^+ sur le potentiel de membrane mitochondrial des cellules SH-SY5Y. Une heure avant l'incubation des cellules en présence de MPP^+ , le milieu est décanté ou non (CTL S) et remplacé par du milieu sans sérum. La mesure du potentiel de membrane est réalisée après 3 ou 8 heures d'incubation des cellules en présence ou en absence (CTL SS) de concentrations croissantes en MPP^+ . Un contrôle positif est réalisé en incubant les cellules pendant les dernières 35 minutes en présence de FCCP à $0,1 \mu\text{M}$. Les résultats sont exprimés en tant que moyennes \pm un écart-type ($n=3$).

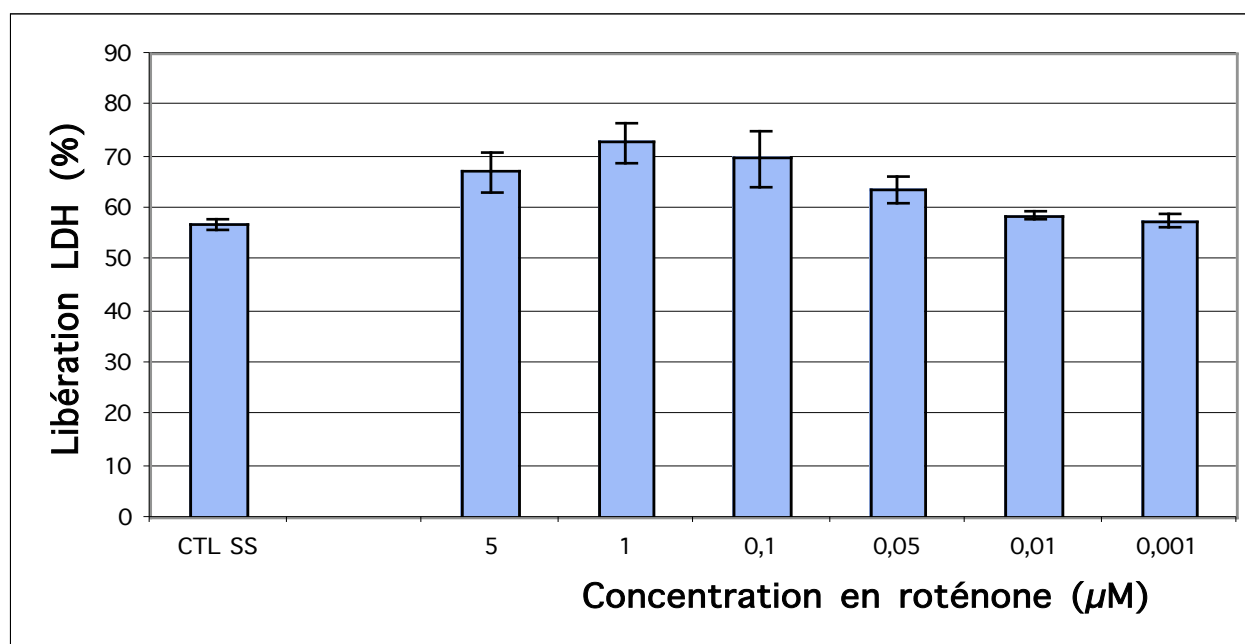


Figure III.13: Effet de la roténone sur la libération de la lactate déshydrogénase (LDH) chez les cellules HepG2. Une heure avant l'incubation des cellules en présence de roténone, le milieu de culture est décanté et remplacé par du milieu DMEM sans sérum. La mesure de la libération de LDH est réalisée après 16 heures d'incubation en présence ou en absence (CTL SS) de concentrations croissantes en roténone. Les résultats sont exprimés en tant que moyennes \pm un écart-type ($n=3$).

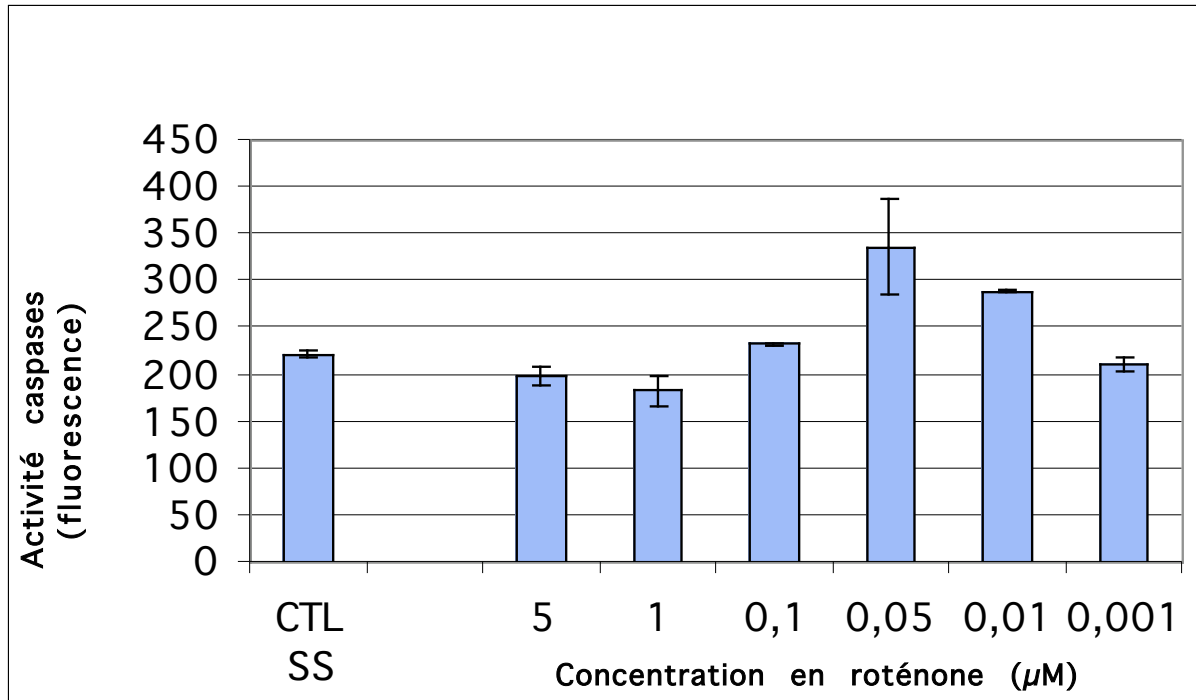


Figure III.14: Effet de la roténone sur l'activité des caspases chez les cellules HepG2. Une heure avant l'incubation des cellules en présence de roténone, le milieu de culture est décanté et remplacé par du milieu DMEM sans sérum. La mesure de l'activité des caspases est réalisée après une incubation de 4 heures des cellules en présence ou en absence (CTL SS) de concentrations croissantes en roténone. Les résultats sont exprimés en tant que moyennes \pm un écart-type ($n=3$).

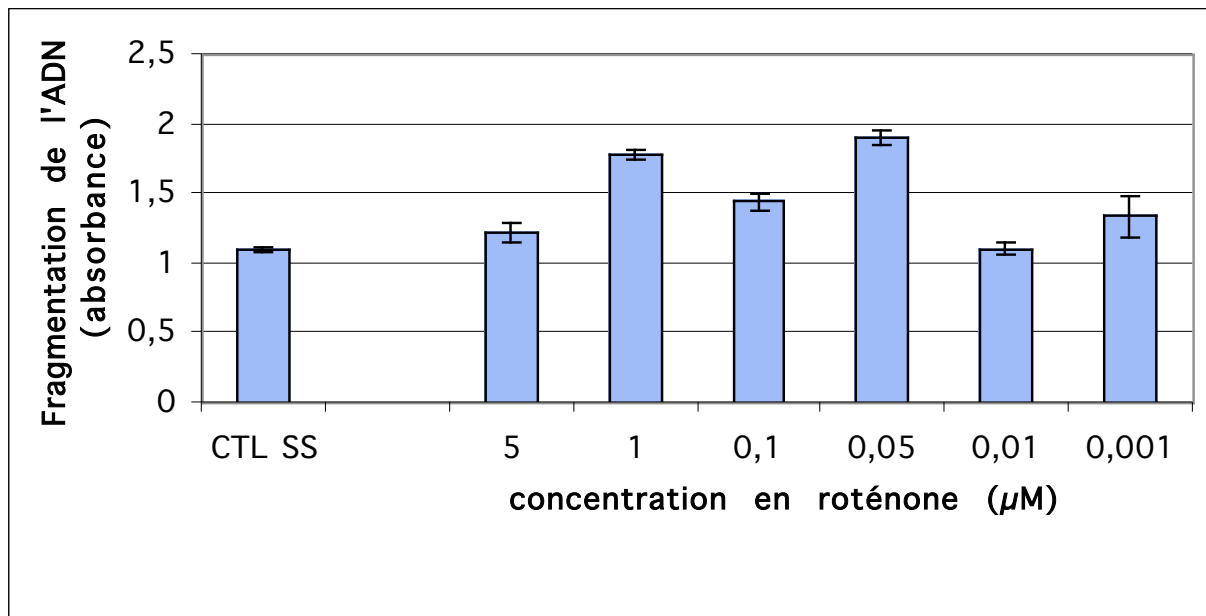


Figure III.15: Effet de la roténone sur la fragmentation de l'ADN chez les cellules HepG2. Une heure avant l'incubation des cellules en présence de roténone, le milieu de culture est décanté et remplacé par du milieu DMEM sans sérum. La mesure de la fragmentation de l'ADN est réalisée après une incubation de 16 heures des cellules en présence ou en absence (CTL SS) de concentrations croissantes en roténone. Les résultats sont exprimés en tant que moyennes \pm un écart-type ($n=3$).

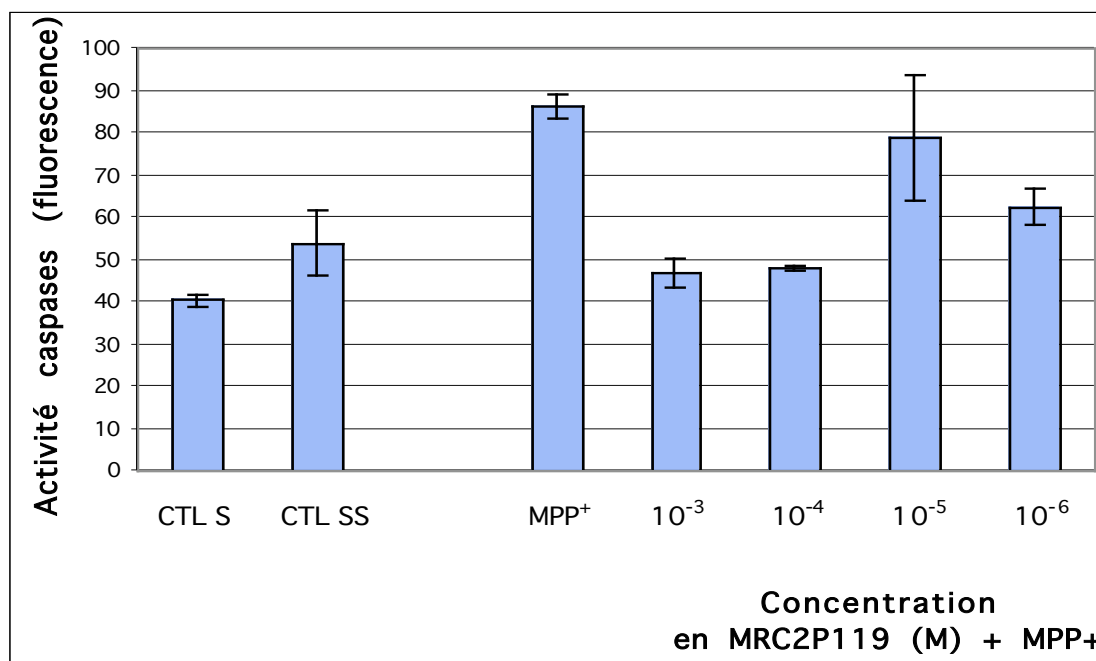
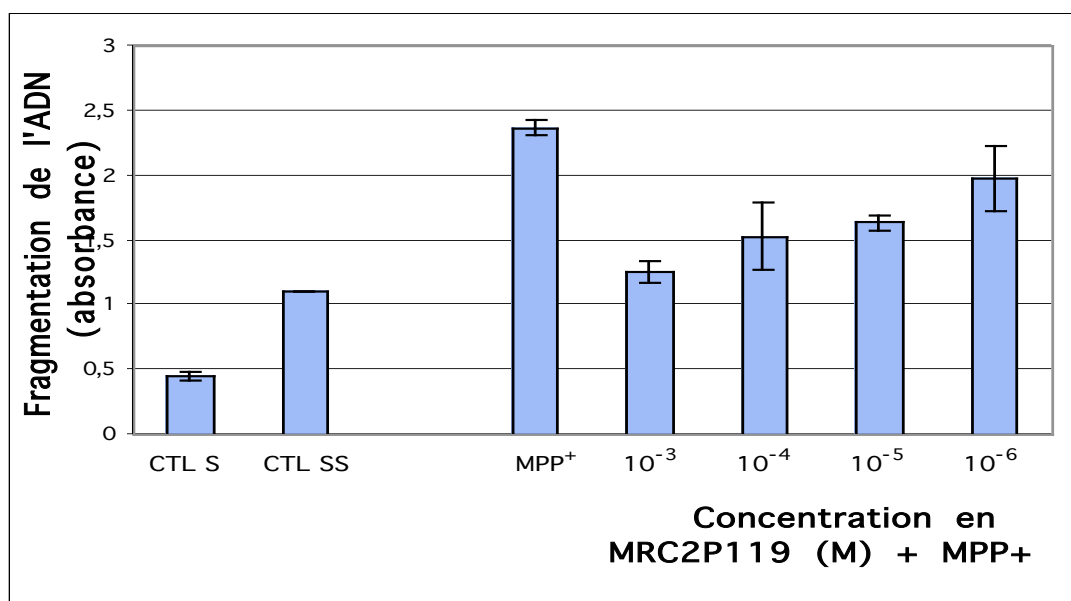


Figure III.17: Effet de la molécule MRC2P119 sur l'activation des caspases induite par le MPP⁺ chez les cellules SH-SY5Y. Une heure avant l'incubation des cellules en présence de MPP⁺, le milieu de culture est décanté ou non (CTL S) et remplacé par du milieu DMEM sans sérum et les cellules sont incubées avec des concentrations croissantes en molécule MRC2P119. Après une heure, les cellules sont incubées avec ou sans (CTL SS) le MPP⁺ à 2,5 mM. La mesure de l'activité des caspases est réalisée après une incubation de 4 heures avec le MPP⁺. Les résultats sont exprimés en tant que moyennes \pm un écart-type (n=3).

(a)



(b)

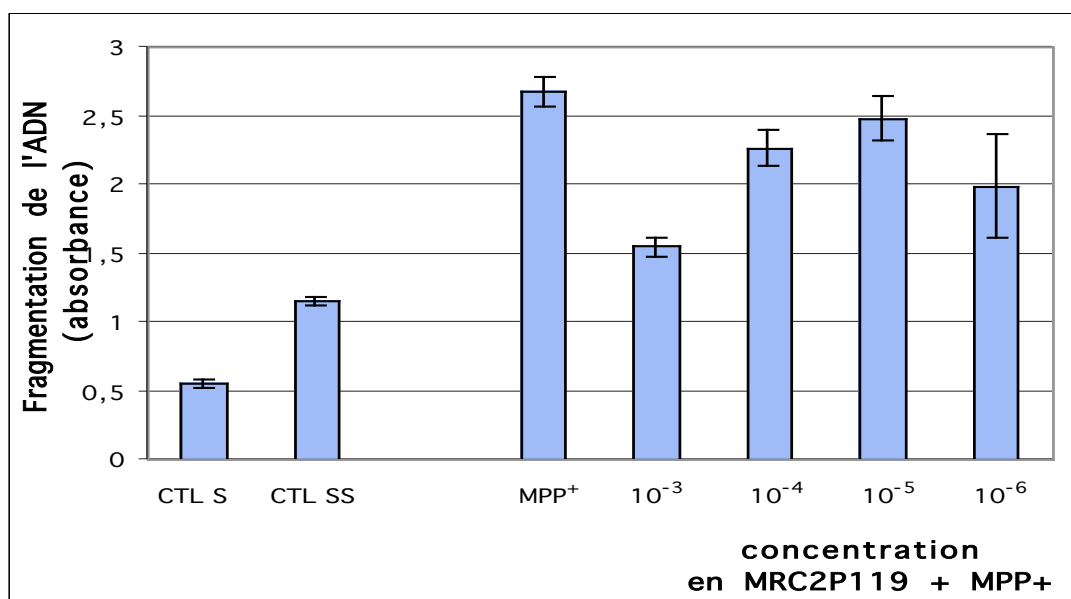
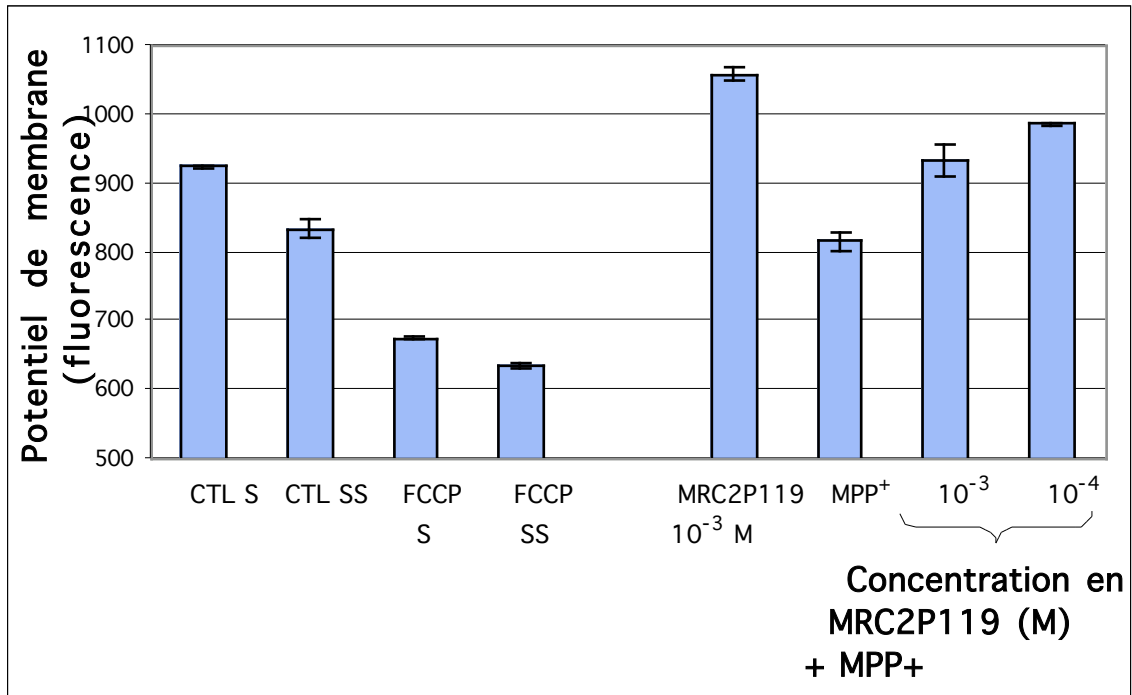


Figure III.20: Effet de la molécule MRC2P119 sur la fragmentation de l'ADN induite par le MPP⁺ chez les cellules SH-SY5Y. Une heure avant l'incubation des cellules en présence de MPP⁺, le milieu de culture est décanté ou non (CTL S) et remplacé par du milieu DMEM sans sérum et les cellules sont ensuite incubées en présence de concentrations croissantes en molécules MRC2P119. Après une heure, les cellules sont incubées en présence de MPP⁺ à 2,5 mM. La mesure de la fragmentation de l'ADN est réalisée après une incubation de 16 heures (a) ou de 24 heures (b). Les résultats sont exprimés en tant que moyennes \pm un écart-type (n=3).

(a)



(b)

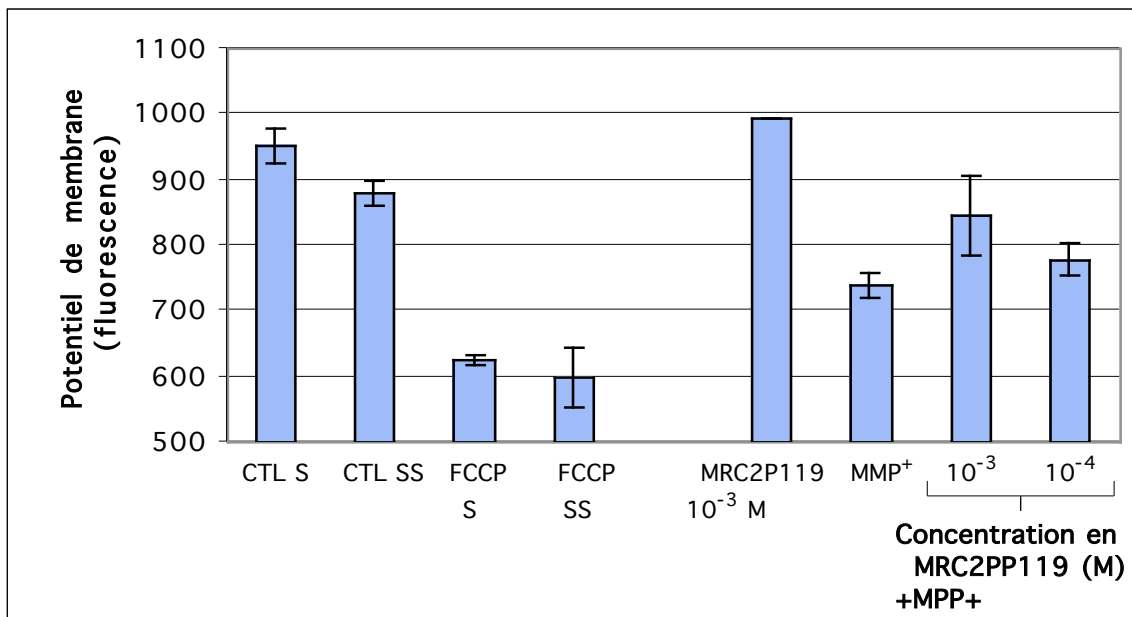


Figure III.21: Effet de la molécule MRC2P119 sur le potentiel de membrane mitochondrial en présence de MPP⁺ chez les cellules SH-SY5Y. Une heure avant l'incubation des cellules en présence de MPP⁺, le milieu de culture est décanté ou non (CTL S) et remplacé par du milieu DMEM sans sérum et les cellules sont incubées en présence de concentrations croissantes en molécule MRC2P119. Après une heure, les cellules sont incubées en présence ou non (CTL SS) de MPP⁺ 2,5 mM. La mesure du potentiel de membrane est réalisée après une incubation de 3 heures (a) ou de 8 heures (b). Un contrôle positif est réalisé en incubant les cellules pendant les dernières 35 minutes en présence de FCCP à 0,1 μ M. Les résultats sont exprimés en tant que moyennes \pm un écart-type (n=3).